(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 593 084**

(51) Int. CI.:

C12N 1/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2010 PCT/EP2010/053758**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10108909**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2010 E 10709743 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2411502**

(54) Título: **Procedimiento para la producción de una cantidad elevada de ácido glicólico mediante fermentación**

(30) Prioridad:

24.03.2009 EP 09155971
24.03.2009 US 162712 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2016

(73) Titular/es:

METABOLIC EXPLORER (100.0%)
Biopole Clermont-Limagne
63360 Saint Beauzire, FR

(72) Inventor/es:

DISCHERT, WANDA y
SOUCAILLE, PHILIPPE

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de una cantidad elevada de ácido glicólico mediante fermentación.

Campo de la invención

La presente invención trata de un procedimiento mejorado para la bioconversión de una fuente de carbono fermentable en ácido glicólico mediante un microorganismo recombinante portador de nuevas modificaciones genéticas tal como Δ*ldhA*, Δ*mgsA*, *arcA* y Δ*lldP*, Δ*glcA*, Δ*yjcG* y su combinación permitiendo una producción con mayor rendimiento, valoración y productividad.

Antecedentes de la invención

El ácido glicólico ($HOCH_2COOH$) es el miembro más sencillo de la familia de los *alfa-hidroxiácidos* a la que pertenecen los ácidos carboxílicos. El ácido glicólico tiene una funcionalidad doble con los grupos alcohol y los grupos ácidos funcionales moderadamente fuertes en una molécula muy pequeña. Lo que se traduce en atributos químicos únicos y una química de alcoholes y ácidos típica.

El ácido glicólico utiliza los grupos de ácidos hidroxilos y carboxílicos para formar complejos de anillos de cinco miembros (quelatos) con metales polivalentes. Esta capacidad de formar complejos de iones metálicos es útil para la disolución de la escala de agua dura y la prevención de depósitos, especialmente en aplicaciones de limpieza con ácidos en las que un correcto lavado es un factor determinante. Sus propiedades lo hacen ideal para un amplio espectro de aplicaciones industriales y de consumo, incluyendo su uso en la rehabilitación de manantiales, industria del cuero, industria del petróleo y gas, industria de lavandería y textil y como componente para productos de cuidado personal. El ácido glicólico se somete a reacciones con ácidos y alcoholes orgánicos para formar ésteres. Los ésteres glicólicos de alquilo de bajo peso molecular presentan propiedades de solvencia no habituales y se pueden utilizar como sustitutos de n- e isopropanol, etilenodiamina, fenol, m-cresol, acetato de 2-etoxietilo y lactato de metilo y etilo. Los ésteres de mayor peso molecular se pueden utilizar en formulaciones de productos de cuidado personal.

El ácido glicólico también se puede utilizar para la producción de varios materiales poliméricos, incluyendo las resinas termoplásticas que están formadas por ácido poliglicólico. Las resinas que están formadas por ácido poliglicólico presentan excelentes propiedades de barrera de gas. Además, dichas resinas termoplásticas formadas por ácido poliglicólico se pueden utilizar para producir materiales de envasado con las mismas propiedades (por ejemplo, los recipientes de bebidas, etc.). Los polímeros de poliéster se hidrolizan gradualmente en entornos acuosos a niveles controlables. Esta propiedad los hace útiles para aplicaciones biomédicas como por ejemplo suturas solubles y en aplicaciones en las que se necesita una liberación controlada de ácido para reducir el pH. Actualmente, se consumen más de 15,000 toneladas de ácido glicólico anualmente en los Estados Unidos.

La producción biológica del ácido glicólico, o sus precursores, a partir de un sustrato de carbono económico como por ejemplo glucosa u otros azúcares, presentada en la figura 1, se divulga en los documentos WO 2007/140816, WO 2006/034156 y WO 2007/141316. El microorganismo descrito en estas aplicaciones está genomanipulado para mejorar el flujo en la vía de glioxilato, Además, el microorganismo descrito en los documentos WO 2007/140816 y WO 2007/141316 está además genomanipulado:

- para aumentar la conversión del glioxilato en glicolato, y
- para reducir el metabolismo del glicolato y su producto intermedio, el glioxilato.

El documento WO 2007/140816 describe más específicamente un microorganismo recombinante que produce ácido glicólico, que presenta las modificaciones genéticas: atenuación de los genes *aceB, gcl, eda, glcDEFGB, aldA, icIR, poxB, ackA, pta, edd* y la sobreexpresión de los genes *aceA, ycdW*.

El documento WO 2006/034156 divulga el concepto de producción de ácido carboxílico (que incluye el precursor de glioxilato del ácido glicólico) cultivando microorganismos recombinantes que comprenden las modificaciones genéticas siguientes:

- atenuación de los genes *ack, pta, poxB, adhE, arcA, fadR, fruR, fum, icd, icl, iclR, ldhA, mdh, pdl, ptsF, ptsG y sdhAB* y,

- sobreexpresión de los genes *aceA, aceB, aceK, act, acs, citZ, galP, pepC y pyc*.

Las modificaciones propuestas en las técnicas anteriores tienen sin embargo un impacto directo sobre las reacciones terminales de la vía de síntesis del glicolato o sobre los productos intermedios más cercanos del glicolato. Todos comparten el mismo objetivo, dirigir el flujo del carbono en la producción del ácido glicólico o sus precursores y prevenir su catabolismo.

La producción biológica de un ácido glicólico requiere la formación de un glioxilato como producto intermedio, que se

reduce a glicolato mediante una óxidorreductasa dependiente de NADPH codificada por el gen *ycdW* (Nunez *et al.,* (2001) Biochemistry, 354, 707-715). El glioxilato es un producto intermedio del ciclo del glioxilato, una derivación del ciclo del TCA (Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass, revisado en Neidhardt, F. C. (Ed. in Chief), R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. E. Umbarger (eds). 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology). Antes de ingresar al ciclo del TCA, el flujo de carbono se somete a una glicólisis en la que se realizan varias reacciones y se puede optimizar para mejorar la producción del compuesto deseado.

La glicólisis es una secuencia de diez reacciones con diez compuestos intermedios que convierten la glucosa en piruvato. Los productos intermedios proporcionan puntos de entrada a la glicólisis y pueden ser también útiles directa o indirectamente. Por ejemplo, el producto intermedio fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) es una fuente de lactato a través de la proteína MgsA. El mismo caso ocurre con la molécula de piruvato convertida en lactato mediante la lactato-deshidrogenasa, LdhA. Ambas enzimas consumen moléculas de la vía glucolítica, lo que implica que una parte del flujo de carbono produce lactato, un subproducto no deseado en ese caso. El gen *ldhA* se atenúa en los procesos para la producción de succinato, como en una cepa bacteriana en el rumen (WO2008/0134051A1) o en *E. coli* para la producción de succinato con un alto rendimiento. Por otro lado, el *ldhA* se sobreexpresa en procesos destinados a la síntesis del lactato (US2007/116852A1). Se encontró un equivalente para *mgsA*, que se elimina entre otras modificaciones genéticas para la producción de 1,3-propanodiol (WO2004/033646A2), pero que se sobreexpresa para la síntesis de 1,2-propanodiol (WO2008/116852A1). Mediante la atenuación de las dos actividades, se debe mejorar la producción de ácido glicólico y, al mismo tiempo, se debe reducir la síntesis del lactato.

De la misma manera, toda modificación genética que aumente los flujos glucolíticos y de TCA, importación de glucosa o actividad catalítica de las enzimas glucolíticas y de TCA mejoraría la producción de glicolato. La atenuación de la actividad de ArcA es una de esas mutaciones. En efecto, la proteína demostró tener participación en la represión de los genes que codifican las enzimas mencionadas anteriormente.

La comprensión de la regulación global del sistema del Arc se inició con el documento de Iuchi y Lin en 1988 (Iuchi y Lin, 1988, PNAS; 85: 1888-1892) en el que se describía la identificación del gen *arc*A y el efecto de su mutación en el metabolismo aerobio en *E. coli*. El sistema de transducción de señales de dos componentes ArcAB (control de respiración aerobia) modula, a nivel de la transcripción, la expresión de entre 100 y 150 operones participantes en el metabolismo de la energía, transporte, supervivencia, catabolismo y en el estado redox de la célula (Liu y DeWulf 2004, *J Biol Chem*, 279:12588-12597; Lynch y Lin, 1996 Responses to molecular oxygen; in Neidhardt FC, Curtiss III RJ, Ingraham L, Lin ECC, Low KB, Magasanik BW, Zeznikoff S, Riley M, Schaechter M, Umbarger HE (eds) *Escherichia coli* and Salmonella: Cellular and Molecular Biology, ed 2. Washington, American Society for Microbiology, 1996, vol 1, pág. 1526-1538). La principal función del par de transducción de señales ArcAB es la regulación de la transición de las rutas aerobias a las anaerobias en *E. coli*. Con el trabajo de Shalel-Levanon y sus colegas se logró una mayor comprensión de la correlación entre el nivel de aerobiosis y el control ejercido por la regulación global (*Biotechnol. Bioeng*. 2005a; 89:556-564 and *Biotechnol. Bioeng*. 2005b; 92:147-159). Estos estudios demostraron la represión de los genes de TCA mediante ArcA. Estos resultados fueron confirmados por estudios fisiológicos completos sobre el efecto de ArcA en el catabolismo de glucosa en *E. coli* en diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno. Se observaron varios cambios en un mutante de Δ*arcA* y en una microaerobiosis como por ejemplo aumento de la respiración, alteración en la distribución del flujo de electrones sobre las citocromo oxidasas terminales O y D y modificación del estado redox intracelular (Aleexeva *et al.*, 2003, *J. Bacteriol*. 185:204-209). El trabajo de Perrenoud y Sauer en 2005 proporcionó nuevos elementos para comprender la regulación de ArcAB, demostrando que el control de los flujos de los ciclos de TCA aerobios y completamente anaeróbicos fue ejercido por ArcA, independientemente de su cinasa sensora cognada, la ArcB (*J. Bacteriol*. 2005, 187:3171-3179).

Todos ellos hacen de ArcA un regulador global en *E. coli*. Su deleción se describe en diversas patentes que afirman la producción en aerobiosis o anaerobiosis de una molécula deseada. Por ejemplo, Δ*arcA* mejora la producción de succinato y 1,2-propanodiol en aerobiosis y en anaerobiosis (US 2006/0073577A1; WO2006/020663 y WO2008/116848). La disminución de la actividad de ArcA entre otras modificaciones genéticas también fue descrita en patentes para la producción de L-aminoácido como por ejemplo L-lisina y ácido L-glutámico por Ajinomoto (EP 1 382686A1) y para la producción de 1, 3-propanodiol (WO2004/033646) por DuPont de Nemours and Co.

Tres proteínas llamadas GlcA, LldP y YjcG se caracterizaron en diversas publicaciones como importadores de glicolato y lactato (Nunez, F. *et al.*, 2001 *Microbiology*, 147, 1069-1077; Nunez, F. *et al.*, 2002 *Biochem. And Biophysical research communications* 290, 824-829; Gimenez, R. *et al.*, 2003 *J. of Bacteriol*. 185, 21, 6448-6455). Según las publicaciones mencionadas anteriormente, la GlcA parece ser más específica de glicolato y la Lldp tiene más afinidad para la molécula de lactato. Una cepa en la que se eliminen las tres glicolato permeasas es totalmente incapaz de importar glicolato exógeno (Gimenez, R. *et al.*, 2003 *J. of Bacteriol*. 185, 21, 6448-6455). La atenuación de la importación de glicolato de la cepa que produce glicolato mejoraría la capacidad de resistencia de la célula frente a altas concentraciones de glicolato para mejorar la valoración de la producción.

El problema que debe solucionar la presente invención es la mejora de la producción biológica del ácido glicólico a

partir de un sustrato de carbono económico tal como glucosa u otros azúcares. En la presente memoria también se describen modificaciones genéticas adicionales y, en particular, la combinación de ellas para obtener un mejor rendimiento y valoración de la producción de ácido glicólico mediante fermentación.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para la bioconversión de una fuente de carbono fermentable en ácido glicólico con un alto rendimiento y valoración.

En un aspecto de esta invención, los *microorganismos* recombinantes según la invención son un microorganismo previamente modificado para producir ácido glicólico, que comprende además una atenuación de genes que codifican la lactato-deshidrogenasa (*ldhA*) y la metilglioxal sintetasa (*mgsA*), y opcionalmente:

- atenuación del regulador de control respiratorio aerobio (*arcA*).

- atenuación de por lo menos uno de los genes *glcA, lldP y yjcG,* que codifican las proteínas importadoras de glicolato.

Según la invención, el microorganismo utilizado en el procedimiento se genomanipuló para producir ácido glicólico. Se introdujeron diversas modificaciones en dicho microorganismo y, en particular, las modificaciones que permiten los siguientes cambios metabólicos:

i) el microorganismo no puede metabolizar el glioxilato en otros compuestos que no sean el glicolato, inactivando los genes que codifican las malato sintetasas (*ace*B y *glc*B), la glioxilato carboligasa (*gcl*) y la 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa (*eda*).

ii) el microorganismo no puede metabolizar glicolato atenuando los genes *glcDEFG* y *aldA*.

iii) el flujo de la vía del glioxilato aumenta mediante la atenuación del *icd, acek*, *pta, ackA, pox*B, *iclR o fadR* y/o la sobreexpresión del *aceA*.

iv) la conversión del glioxilato en glicolato aumenta si se utilizan genes codificadores endógenos como el *ycdW.*

v) la disponibilidad de NADPH aumenta con la atenuación de los genes *pgi, udhA* y *edd.*

En otra forma de realización, la invención proporciona asimismo un proceso para la producción de ácido glicólico a partir de un microorganismo recombinante que comprende:

(a) poner en contacto el microorganismo recombinante de la presente invención con, al menos, una fuente de carbono del grupo formado por monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y sustratos de carbono simple a través de los cuales se produce glicolato; opcionalmente

(b) recuperar el ácido glicólico producido en una etapa de polimerización a, al menos, dímeros de ácido glicólico.

(c) recuperar el ácido glicólico mediante la despolimerización a partir de dímeros de ácido glicólico, oligómeros y/o polímeros.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos que son incorporados y constituyen una parte de esta memoria descriptiva ejemplifican la invención y, junto con la descripción, son útiles para explicar los principios de esta invención.

La figura 1 representa la ingeniería genética de la glicólisis, ciclo de TCA y vía del glioxilato en el desarrollo del sistema de producción del ácido glicólico a partir de carbohidratos.

La figura 2 es un diagrama que muestra la construcción del vector pME101- *ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01, llamado pAG25.

La figura 3 es una imagen ampliada de las rutas del lactato y acetato. Algunos de los genes que participan en estas rutas se modifican en la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Salvo definición contraria, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que normalmente cualquier experto en la materia a la que esta invención pertenece entendería.

En la presente invención, los términos “microorganismo” y “bacteria” se utilizan indistintamente y se refieren a la bacteria gramnegativa. En una forma de realización preferida de la invención, los microorganismos pertenecen a la familia de Enterobacteriaceae. La familia de Enteriobacteriaceae está formada (en particular pero no exclusivamente) por los géneros Escherichia, Klebsiella, Salmonella y Pantoea.

El término "cepa mutante" se refiere a una cepa no de tipo salvaje.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos “recombinante”, “modificado/a genéticamente” o “microorganismo modificado” se refieren a una célula hospedadora con una modificación en su genoma, es decir, una adición de ácido nucleico que se produce de forma no espontánea en el organismo o una modificación del ácido nucleico que se produce de forma espontánea en la célula hospedadora. El término "transformación" o "transfección" se refiere a la adquisición de nuevos genes en una célula después de la incorporación de un ácido nucleico exógeno. El término "transformante" se refiere al producto de una transformación.

Los términos “modificación” o “modificar” el nivel de actividad proteica o enzimática producido por una célula hospedadora se refieren al control de los niveles de actividad proteica o enzimática producida durante un cultivo, de forma tal que los niveles aumenten o disminuyan según lo deseado. El término “modificado”, cuando se refiere a un ácido nucleico o polinucleótido, significa que el ácido nucleico se ha alterado de alguna forma en comparación con un ácido nucleico salvaje como por ejemplo mediante mutación en, sustitución, inserción, deleción de una parte o de todo el ácido nucleico o mediante el enlace operativo a una región de control de la transcripción. Ejemplos de mutaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones puntuales, mutaciones en la pauta y deleciones de parte o de todos los genes mencionados.

Por “gen” se entiende un segmento de ADN que participa en la codificación para las regiones promotoras del ARN ribosómico, ARN de transferencia y ARN regulador enlazado operativamente con la expresión de un péptido, polipéptido o proteína, incluyendo la región codificadora, la región no codificadora anterior (“líder”) o posterior a la región codificadora (“tráiler”) así como las secuencias no codificadoras silenciosas (“intrones”) entre segmentos codificadores individuales (“exones”). Codificación se refiere a la representación de aminoácidos, señales de inicio y terminación en un código “triplete” de tres bases.

El término “enlazados/as operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los elementos se encuentran en una distribución tal que les permite estar funcionalmente relacionados. Un promotor está enlazado operativamente con una secuencia codificadora si controla la transcripción de la secuencia, y un centro de unión de ribosomas está enlazado operativamente a una secuencia codificadora si se coloca de forma tal que permite la traducción del ARNm.

Los términos “inactivación” o “atenuación” se refieren a una disminución de la expresión de un gen o una disminución de la actividad de la proteína, producto del gen. El experto en la materia conoce numerosos medios para obtener este resultado y, por ejemplo:

- La introducción de una mutación en el gen, disminuyendo el nivel de expresión de este gen o el nivel de actividad de la proteína codificada.
- La sustitución del promotor natural del gen por un promotor de baja resistencia, dando lugar a una expresión más baja.
- La utilización de elementos que desestabilizan el correspondiente ARN mensajero o la proteína.
- La deleción del gen, en caso de no necesitar ninguna expresión.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y traducción desde un gen a la proteína, producto del gen.

Los términos “sobreexpresión” o “se sobreexpresa” se definen en la presente memoria para indicar, al menos, el 150% de la actividad proteica en comparación con una especie de control adecuada. La sobreexpresión se puede lograr mediante la mutación de la proteína con el fin de producir una forma más activa o una forma que sea resistente a la inhibición mediante la deleción de inhibidores o la adición de activadores y similares. La sobreexpresión también se puede lograr mediante la deleción de represores, adición de múltiples copias del gen a la célula o mediante la regulación al alza del gen endógeno y similares.

Los términos “plásmido” o “vector”, como se utilizan en la presente memoria, se refieren a un elemento extracromosómico que, con frecuencia, transporta genes que no son parte del metabolismo central de la célula y, habitualmente, en forma de moléculas de ADN circular bicatenario.

Los términos “sustrato de carbono”, “fuente de carbono” o “fuente de carbono fermentable” significan toda fuente de carbono capaz de ser metabolizada por un microorganismo en el que el sustrato contiene al menos un átomo de

carbono.

El término "ATCC" significa American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852, EE.UU.

Los términos “glioxilato” y “ácido glioxílico” se utilizan indistintamente.

Los términos "glicolato " y "ácido glicólico" se utilizan indistintamente. El término “ácido glicólico, sus derivados o precursores” designa todos los compuestos intermedios en la vía metabólica de formación y degradación del ácido glicólico. Precursores del ácido glicólico son, en particular: citrato, isocitrato, glioxilato y, en general, todos los compuestos del ciclo del glioxilato (véase la figura 1). Derivados del ácido glicólico son, en particular, ésteres de glicolato como por ejemplo el éster de etilglicolato, éster de metilglicolato y polímeros que contienen glicolato como por ejemplo el ácido poliglicólico.

En la descripción de la presente invención, las enzimas se identifican por sus actividades específicas. Esta definición incluye, de esta manera, todos los polipéptidos con una actividad específica definida también presente en otros organismos, más particularmente, en otros microorganismos. Con frecuencia, las enzimas con actividades similares se pueden identificar por su agrupación en determinadas familias definidas como PFAM o COG.

La PFAM (base de datos de familias de proteínas de alineaciones y modelos ocultos de Markov http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) es una gran recolección de secuencias de proteínas. Con cada PFAM se pueden visualizar múltiples alineaciones, ver dominios de proteínas, evaluar las distribuciones entre los organismos, obtener acceso a otras bases de datos y visualizar estructuras proteicas conocidas.

Las COG (agrupaciones de grupos ortólogos de proteínas http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/) se obtienen comparando las secuencias de proteínas que derivan de 43 genomas de secuencias completas que representan 30 líneas filogenéticas principales. Cada COG se define a partir de al menos tres líneas, permitiendo la identificación de antiguos dominios conservados.

Los expertos en la materia conocen muy bien los medios de identificación de las secuencias homólogas y su porcentaje de homología. E incluyen, en particular, los programas BLAST que se pueden utilizar en la página Web http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ con los parámetros predeterminados indicados en la página Web. Las secuencias obtenidas se pueden entonces utilizar (alinear) con, por ejemplo, los programas CLUSTALW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) o MULTALIN (http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl), con los parámetros predeterminados indicados en estas páginas Web.

Utilizando las referencias de GenBank para los genes conocidos, los expertos en la materia pueden determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Esta tarea de rutina se realiza utilizando las secuencias de consenso que se pueden determinar llevando a cabo alineaciones de secuencias con genes derivados de otros microorganismos y diseñando sondas de degeneración para clonar el gen correspondiente en otro organismo. Estos procedimientos de rutina de biología molecular son muy conocidos por los expertos en la materia y se recogen, por ejemplo, en Sambrook *et al*. (1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2da ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York).

Los genes identificados en la presente solicitud con referencia a *E. coli* se pueden encontrar en todas las bacterias gramnegativas.

La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para la bioconversión de una fuente de carbono fermentable directamente en ácido glicólico utilizando una *bacteria gramnegativa* simple recombinante previamente modificada para producir ácido glicólico y, además, genomanipulada para incluir al menos una atenuación de los genes *ldhA* y mgsA

Preferentemente, dicha bacteria comprende además por lo menos una de las modificaciones siguientes:

- Atenuación del gen *arcA.*

- Atenuación de al menos uno de los genes *glcA, lldP y yjcG* para atenuar la membrana importadora de glicolato,

y combinaciones de los mismos.

Todas las combinaciones de estas modificaciones son posibles y, en particular:

- atenuación de los genes *ldhA* y *mgsA* y atenuación del gen *arcA;*

- atenuación de los genes *ldhA* y *mgsA* y atenuación de la membrana importadora de glicolato*;*

- atenuación de los genes *ldhA* y *mgsA,* atenuación del gen *arcA* y atenuación de la membrana importadora de glicolato.

Los genes se abrevian de la siguiente manera: lactato-deshidrogenasa (*ldhA*), reductasa de metilglioxal (*mgsA*), regulador de control respiratorio aerobio (*arcA*), L-lactato permeasa (*lldP*), glicolato permeasa (*glcA*) e importador de acetato (*yjcG*).

La principal ventaja de estas modificaciones adicionales es la mejora de la producción de ácido glicólico mediante el microorganismo modificado genéticamente. Es más, todas estas modificaciones conducen a una mejora del rendimiento de la producción del 2% al 36% (de 0,39 g/g a 0,52 g/g en comparación con 0,38 g/g) y/o una mejora de la valoración del glicolato del 9% al 28% (de 4,36 g/l a 5,14 g/l en comparación con 4,0 g/l).

En las solicitudes de patente WO 2007/140816 y WO 2007/141316 se describe un microorganismo ya modificado para la producción de ácido glicólico mediante fermentación.

En una forma de realización de la invención, el microorganismo previamente modificado para la producción de ácido glicólico comprende al menos uno de las siguientes modificaciones genéticas:

- una baja capacidad de conversión del glioxilato, excepto para producir glicolato, debido a la atenuación de los genes que codifican las enzimas que consumen glioxilato, un precursor determinante del glicolato: los genes *ace*B y *gclB que codifican* las malato sintetasas, el *gcl* que codifica la glioxilato carboligasa y el *eda* que codifica la 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa;

- unas modificaciones de forma tal que el microorganismo es incapaz de metabolizar el glicolato sustancialmente. Este resultado se puede lograr mediante la atenuación de al menos uno de los genes que codifican las enzimas que consumen glicolato (*glcDEFG* que codifica la glicolato oxidasa y *aldA* que codifica la glicoaldehído deshidrogenasa). La atenuación de los genes se puede realizar mediante la sustitución del promotor natural por un promotor de baja resistencia o por un elemento que desestabilice el correspondiente ARN mensajero o la proteína. En caso de ser necesario, la atenuación completa del gen también se puede lograr mediante la deleción de la correspondiente secuencia de ADN;

- un aumento del flujo de la vía del glioxilato por diferentes medios y, en particular:

  i) la disminución de la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa (ICDH),

  ii) la disminución de la actividad de al menos una de las siguientes enzimas:

    - fosfotransacetilasa, codificada por el gen *pta*
    - acetato cinasa, codificada por el gen *ackA*
    - piruvato oxidasa, codificada por el gen *pox*B mediante la atenuación de genes,

  iii) aumento de la actividad de la enzima isocitrato liasa, codificada por el gen aceA,

  iv) la disminución de la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa cinasa/fosfatasa AceK.

La disminución del nivel de la isocitrato deshidrogenasa se puede lograr mediante la introducción de promotores artificiales que dirigen la expresión del gen *icd*, que codifica la isocitrato deshidrogenasa o mediante la introducción de mutaciones en el gen *icd* que reducen la actividad enzimática de la proteína.

Puesto que la actividad de la proteína ICDH se ve reducida por la fosforilación, es posible que también se pueda controlar mediante la introducción de los genes mutantes *ace*K que aumentan la actividad cinasa o reducen la actividad fosfatasa en comparación con la enzima salvaje AceK.

El aumento de la actividad de la isocitrato liasa se puede lograr ya sea mediante la atenuación del nivel de los genes *iclR o fadR,* que codifican los represores de la vía del glioxilato, mediante la estimulación de la expresión del gen *aceA*, por ejemplo mediante la introducción de promotores artificiales que conducen la expresión del gen o mediante la introducción de mutaciones en el gen *aceA* que aumentan la actividad de la proteína codificada;

- un aumento de la actividad que cataliza la conversión del glioxilato en glicolato mediante la expresión de al menos un gen que codifica un polipéptido que cataliza la reacción. En particular, un gen que codifica una enzima glioxilato reductasa dependiente de NADPH está presente para convertir, en condiciones aerobias, el producto intermedio tóxico, glioxilato, en el producto final de baja toxicidad, glicolato. El gen puede ser exógeno o endógeno y se puede expresar de forma cromosómica o extracromosómica. Un gen que codifica una glioxilato reductasa dependiente de NADPH se puede obtener de los genes *ycd*W *o yia*E a partir del genoma de *E. coli* MG1655. En una forma de realización preferida, aumenta la expresión de al menos uno de dichos genes. En caso de ser necesario, se puede obtener un alto nivel de actividad de la glioxilato reductasa

dependiente de NADPH a partir de genes ubicados de forma cromosómica, utilizando una o varias copias del genoma que se pueden introducir mediante procedimientos de recombinación conocidos por los expertos en la materia. En el caso de los genes extracromosómicos, se pueden utilizar distintos tipos de plásmidos que difieren con respecto a su origen de replicación y, de esta manera, a su número de copias en la célula. Es posible que estén presentes como 1 a 5 copias, aproximadamente 20 o hasta 500 copias, según los plásmidos de número bajo de copias con replicación limitada (pSC101, RK2), plásmidos de número bajo de copias (pACYC, pRSF1010) o plásmidos de gran número de copias (pSK bluescript II). Los genes *ycd*W *o yia*E se pueden expresar utilizando promotores con distinta resistencia que necesitan o no ser inducidos por moléculas inductoras. Son ejemplos los promotores Ptrc, Ptac, Plac, el promotor lambda cI o demás promotores conocidos por los expertos en la materia. La expresión de los genes también se puede reforzar con elementos que estabilicen el correspondiente ARN mensajero (Carrier y Keasling (1998) *Biotechnol. Prog*. 15, 58-64) o la proteína (por ejemplo, marcas GST, Amersham Biosciences).

- aumento de la disponibilidad de NADPH para la glioxilato reductasa dependiente de NADPH. Esta modificación de las características del microorganismo se puede obtener a través de la atenuación de al menos uno de los genes seleccionados entre los siguientes: *pgi* que codifica la glucosa-6-fosfato isomerasa, *udhA que codifica la* transhidrogenasa soluble y *edd* que codifica la actividad de la 6-fosfogluconato deshidratasa. Con estas modificaciones genéticas, todos los glucosa-6-fosfatos tendrán que ingresar en la glicólisis a través de la vía del pentosa fosfato y se producirán 2 NADPH por glucosa-6-fosfato metabolizado.

Como se ha expuesto anteriormente, el microorganismo ya modificado para la producción de ácido glicólico comprende, en particular, una atenuación del gen *aceK*. La enzima de la derivación del ácido glicólico ICL está en competición directa con la enzima isocitrato deshidrogenasa (ICDH) del ciclo de Krebs por su sustrato común y, aunque la ICDH tiene mucha más afinidad con el isocitrato, con el flujo de carbono por la ICL gracias al alto nivel intracelular del isocitrato y la fosforilación/inactivación reversible de una gran fracción de ICDH. La inactivación reversible se debe a la fosforilación reversible catalizada por la ICDH cinasa/fosfatasa, llamada AceK, que presenta ambas actividades catalíticas en el mismo polipéptido (Laporte DC 1989, *Biochimie* Sep-Oct; 71(9-10):1051-7; Ikeda TP, 1992, *J Bacteriol.* Feb;174(4):1414-6.; Cozzone AJ, El-Mansi M. 2005, *J Mol Microbiol Biotechnol*. 9(3-4):132-46).

Sería ventajoso para el procedimiento de la invención controlar totalmente la actividad de la ICDH eliminando de la célula todas las regulaciones, incluyendo *aceK*. Una deleción de aceK puede causar una disminución de la actividad de la ICDH. Sin embargo, la expresión artificial más baja del gen *icd* mediante modificación genética de su promotor permite la construcción de cepas productoras con un nivel bajo definido de ICDH, permitiendo la producción de glioxilato y, de esta manera, glicolato en un fondo de Δ*aceK*.

El microorganismo según la invención es un microorganismo inicialmente modificado para la producción de ácido glicólico que además comprende una atenuación de los genes *ldhA* y *mgsA*. El gen *ldhA* codifica la lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) que convierte piruvato, el producto final de la glicólisis, en ácido láctico. El gen *mgsA* codifica la metilglioxal sintetasa (EC 4.2.3.3) que convierte el fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) en metilglioxal.

Ambas enzimas consumen moléculas con una importante participación bioquímica en la vía metabólica de la glicólisis y producen lactato. Con el fin de ahorrar un poco de carbono para la producción de glicolato y para evitar la acumulación de lactato como subproducto, la deleción de *ldhA* y *mgsA* se realiza en la cepa utilizada en el procedimiento de la invención. El objetivo de dichas deleciones es mejorar el rendimiento de la producción del glicolato y facilitar la purificación de nuestro producto.

Otra forma de realización de la invención proporciona el procedimiento en el que el microorganismo según la invención comprende además una atenuación del gen *arcA*. Tal como se utiliza en la presente memoria, “ArcA” y “*arcA*” se refieren a un polipéptido y a una región codificadora, respectivamente.

ArcA es uno de los dos polipéptidos que componen el sistema regulatorio ArcAB. Los sistemas de transducción de señales de dos componentes permiten que las bacterias detecten, respondan y se adapten a una amplia gama de entornos, tensiones y condiciones de crecimiento. En el sistema de dos componentes prototípico, una histidina cinasa sensora cataliza su autofosforilación y, posteriormente, transfiere el grupo fosforilo a un regulador de respuesta que puede realizar cambios en la fisiología celular generalmente regulando la expresión génica. Por ejemplo, ArcB es la histidina cinasa enlazada a la membrana y ArcA, el regulador de respuesta (Georgellis *et al.*, 1999). El sistema regulador permite que *E. coli* responda a una amplia gama de concentraciones de oxígeno, desde condiciones totalmente aerobias a microaerobias a totalmente anaerobias.

ArcA controla la expresión de numerosos operones en *E. coli* y demás bacterias gramnegativas. Incluidos en el regulón de ArcA se encuentran principalmente los factores que participan en las rutas que generan energía celular a partir de sustratos de azúcares: numerosas deshidrogenasas de la clase de las flavoproteínas, oxidasas terminales, enzimas del ciclo de ácido tricarboxílico, enzimas de derivación del glioxilato, enzimas que participan en el metabolismo fermentativo (Iuchi, S. y Lin, E. C. C. (1993) *Mol. Microbiol*. 9, 9-15; Bauer, C. E., Elsen, S. y Bird, T. H. (1999) *Annu. Rev. Microbiol*. 53, 495-523). ArcA provoca una disminución de la expresión de muchos de estos

operones durante el crecimiento anaerobio y durante las condiciones aerobias a una alta tasa de crecimiento (por ejemplo, crecimiento exponencial) (S. Iuchi *et al.*, *Cell*, 66, 5-7 (1991)). Es conocido que la proteína de ArcA controla negativamente la expresión de los genes para las enzimas del ciclo de ácido tricarboxílico (TCA). En una cepa con disrupción de *arcA*, la expresión de los genes para el ciclo de TCA aumenta.

Para mejorar la productividad y el rendimiento de la síntesis del glicolato, el gen *arcA* se elimina en la cepa utilizada en el procedimiento de la invención. En efecto, Δ*arcA* combinado con las modificaciones genéticas ya hechas en la cepa debería elevar el flujo en el ciclo de TCA y en la derivación del glioxilato hacia la producción de glicolato.

Asimismo, se demostró que ArcA tenía participación en la regulación de la expresión de PTS en respuesta al estado redox celular (Jeong, J-Y. *et al.*, 2004, *Journal of Bio. Chem*.). La forma fosforilada de ArcA reprime la transcripción de *ptsG* desde el promotor P1. Incluso si ArcA se fosforila principalmente en condiciones anaerobias y ArcB se autofosforila en ausencia de oxígeno, no se puede admitir que ArcA resulte fosforilada por una cinasa de otro sistema de dos componentes (reacción cruzada) en condiciones aerobias (Laub, M. T. y Goulian, M. *Annu. Rev. Genet.* (2007); 41:121-45). Por lo tanto, no se puede admitir una represión de la expresión de *ptsG* por parte de ArcA-P en condiciones aerobias. Éste es otro motivo de la deleción del gen *arcA* en glicolato que produce cepas utilizadas en el procedimiento descrito en la presente invención.

En otra forma de realización específica de la invención, el microorganismo según la invención además comprende una atenuación de la importación de la membrana importadora de glicolato. En particular, se atenúa al menos uno de los genes *glcA, lldP y yjcG,* que codifican las proteínas importadoras de glicolato.

La proteína importadora de la membrana (o simplemente, importadora) es una proteína que tiene participación en el movimiento de los iones, pequeñas moléculas o macromoléculas como por ejemplo otra proteína que se encuentre en toda la membrana biológica. Las proteínas importadoras son proteínas integrales de membranas; es decir, existen por dentro y se extienden por toda la membrana a la que importan sustancias. Las proteínas pueden asistir en el movimiento de sustancias mediante una difusión facilitada o una importación activa. Las tres proteínas mencionadas anteriormente se caracterizaron todas como importadoras de glicolato y lactato (Nunez, F. *et al.*, 2001 *Microbiology*, 147, 1069-1077; Nunez, F. *et al.*, 2002 *Biochem. And Biophysical research communications* 290, 824-829; Gimenez, R. *et al.*, 2003 *J. of Bacteriol.* 185, 21, 6448-6455). Una cepa mutada en cada glicolato permeasa no puede crecer en glicolato como fuente de carbono, demostrando que la cepa no puede importar glicolato (Gimenez, R. *et al.*, 2003). Mediante la atenuación de la importación del glicolato en la célula utilizada para producir ácido glicólico, el objetivo es mejorar la capacidad de la cepa de resistir y acumular ácido glicólico y mejorar de esta manera la valoración de la producción.

En una forma de realización específica de la invención, se atenúan los tres genes *glcA, lldP* y *yjcG*.

Asimismo, sería ventajoso aumentar la exportación del ácido glicólico a partir de este microorganismo que produce ácido glicólico. Los expertos en la materia conocen numerosos medios para obtener dicho aumento de la exportación de un metabolito específico, en particular, mejorando la actividad y/o la expresión de una proteína de exportación, capaz de exportar el ácido glicólico desde el microorganismo hasta el medio.

En una forma de realización específica, la invención proporciona un procedimiento para la producción de ácido glicólico, y sus derivados y precursores, que comprende:

- cultivar el organismo recombinante de la presente invención, en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono, siendo dicha fuente seleccionada preferentemente de entre el grupo que consiste en glucosa, sacarosa, los monosacáridos fructosa, manosa, xilosa y arabinosa, los oligosacáridos galactosa y celobiosa, almidón o sus derivados, glicerol, sustratos de carbono simple produciendo así ácido glioxílico, y

- recuperar el ácido glicólico del medio de cultivo.

En una forma de realización preferida, el procedimiento anterior es realizado según las etapas siguientes:

a) fermentar el microorganismo según la invención,

b) concentrar el glicolato en dicho microorganismo o en el medio,

c) aislar el ácido glicólico del caldo de fermentación y/o la biomasa restante opcionalmente en partes o en la cantidad total (0-100%) en el producto final.

Opcionalmente, el ácido glicólico producido puede ser aislado mediante una etapa de polimerización a por lo menos dímeros de ácido glicólico. Todavía preferentemente, el ácido glicólico puede recuperarse mediante despolimerización de dímeros, oligómeros y/o polímeros de glicolato.

Los expertos en la materia pueden definir las condiciones de cultivo para los microorganismos, según la invención. En particular, las bacterias *gramnegativas* fermentan a una temperatura de 20℃ a 55℃, prefer entemente de 25℃ a 40℃ y, más específicamente, de aproximadamente 37° C para *E. coli*.

La fermentación se realiza generalmente en fermentadores con un medio de cultivo inorgánico de composición definida y adaptada a las bacterias utilizadas, que contiene al menos una fuente de carbono simple y, en caso de ser necesario, un cosustrato necesario para la producción del metabolito.

La invención se refiere asimismo al microorganismo según se describió anteriormente. Preferentemente, dicho microorganismo pertenece a la familia de Enterobacteriaceae. Más preferentemente, el microorganismo es del género Escherichia e, incluso más preferentemente, es *Escherichia coli.*

Ejemplos

Se utilizaron diversos protocolos para obtener las cepas que producen ácido glicólico descritas en los siguientes ejemplos. Los protocolos se detallan a continuación.

Protocolo 1: Introducción de un producto de la PCR para la recombinación y selección de los recombinantes (sistema FRT)

Los oligonucleótidos seleccionados y presentados en la tabla 1 para la sustitución de un gen o una región intergenética se utilizaron para amplificar ya sea el casete de resistencia al cloranfenicol a partir del plásmido pKD3 o el casete de resistencia a la kanamicina a partir del plásmido pKD4 (Datsenko, K.A. y Wanner, B.L. (2000)). El producto de la PCR obtenido se introdujo posteriormente, mediante electroporación, en la cepa receptora con el plásmido pKD46 en el que el sistema λ Red (λ,β,.exo) expresado favorece en gran medida la recombinación homóloga. Posteriormente, se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico y se comprobó la inserción del casete de resistencia mediante el análisis por PCR con los oligonucleótidos correspondientes presentados en la tabla 2.

Protocolo 2: Deleción del casete de resistencia (sistema FRT)

Los casetes de resistencia al cloranfenicol y/o kanamicina se eliminaron según la siguiente técnica: el plásmido pCP20 que transporta la FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia al cloranfenicol y/o kanamicina se introdujo en la cepa mediante electroporación. Después de un cultivo en serie a 42℃, se comprobó la pérdida de los casetes de resistencia al antibiótico mediante el análisis por PCR con los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

Protocolo 3: Transducción con el fago P1 para la supresión de un gen

Se suprimió el gen seleccionado mediante la sustitución del gen por un casete de resistencia (kanamicina o cloranfenicol) en la cepa de *E. coli* receptora mediante la técnica de la transducción con el fago P1. El protocolo se realizó en dos etapas: (i) la preparación del lisado del fago en la cepa donante con un único gen eliminado y (ii) la transducción de la cepa receptora mediante este lisado del fago.

Preparación del lisado del fago

- Siembra con 100 µl de un cultivo durante la noche de la cepa MG1655 con un único gen eliminado de 10 ml de LB + Cm 30 µg/ml + glucosa 0,2% + 5 mM de $CaCl_2$.
- Incubación durante 30 min a 37ºC con agitación.
- Adición de 100 µl de lisado del fago P1 preparado en la cepa donante MG1655 (aprox. 1 x 10^9 fago/ml).
- Agitación a 37ºC durante 3 horas hasta que todas las células estén lisadas.
- Adición de 200 µl de cloroformo y agitación.
- Centrifugación durante 10 min a 4500 g para eliminar restos celulares.
- Transferencia del sobrenadante a un tubo estéril y adición de 200 µl de cloroformo.
- Almacenamiento del lisado a 4ºC.

Transducción

- Centrifugación durante 10 min a 1500 *g* de 5 ml de un cultivo durante la noche de la cepa receptora de *E. coli*

en un medio LB.

- Suspensión del sedimento celular en 2,5 ml de $MgSO_4$ 10 mM, $CaCl_2$ 5 mM.
- Tubos de control: 100 µl de células 100 µl de fagos P1 de la cepa MG1655 con un único gen eliminado.
- Prueba con tubo ensayo: 100 µl de células + 100 µl de fagos P1 de la cepa MG1655 con un único gen eliminado.
- Incubación durante 30 min a 30ºC sin agitación.
- Adición de 100 µl de citrato de sodio 1 M en cada tubo y agitación.
- Adición de 1 ml de LB.
- Incubación durante 1 hora a 37ºC con agitación.
- Preparación de cultivos en placas LB + Cm 30 µg/ml después de la centrifugación de tubos durante 3 min a 7000 rpm.
- Incubación a 37ºC durante la noche.

Posteriormente, se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico y se comprobó la inserción de la deleción mediante un análisis por PCR con los oligonucleótidos correspondientes presentados en la tabla 2.

Protocolo 4: Introducción de un producto de la PCR para la recombinación y selección de los recombinantes (sistema Cre-LOX)

Los oligonucleótidos seleccionados y presentados en la tabla 1 para la sustitución de un gen o una región intergenética se utilizaron para amplificar ya sea el casete de resistencia al cloranfenicol a partir del plásmido loxP-cm-loxP (Gene Bridges) o el casete de resistencia a la neomicina a partir del plásmido loxP-PGK-gb2-neo-loxP (Gene Bridges). El producto de la PCR obtenido se introdujo posteriormente, mediante electroporación, en la cepa receptora con el plásmido pKD46 en donde el sistema λ Red (λ,β,.exo) expresado favorece en gran medida la recombinación homóloga. Posteriormente, se seleccionaron los transformantes resistentes al antibiótico y se comprobó la inserción del casete de resistencia mediante el análisis por PCR con los oligonucleótidos correspondientes presentados en la tabla 2.

Protocolo 5: Deleción de los casetes de resistencia (sistema Cre-LOX)

Los casetes de resistencia al cloranfenicol y/o kanamicina se eliminaron según la siguiente técnica: el plásmido pJW168 (Palmeros B. y col (2000), *Gene* 247: 255-264) que transporta la Cre recombinasa que actúa en los sitios Cre-LOX de los casetes de resistencia al cloranfenicol y/o kanamicina se introdujo en la cepa mediante electroporación. Después de un cultivo en serie a 42ºC, se comprobó la pérdida de los casetes de resistencia al antibiótico mediante el análisis por PCR con los oligonucleótidos presentados en la tabla 2.

Tabla 1

Oligonucleótidos utilizados para las construcciones descritas en los siguientes ejemplos

Gen	Nombres de oligos	SEC ID nº	Homología con la región cromosómica (Ecogene)	Secuencias
icd	Ome 703 Ptrc-icd F	N°1	1194281-1194345	GGACGCAAACGCATATGCAACGTGGT GGCAGACGAGCAAACCAGTAGCGCTC GAAGGAGAGGTGATCACACTGGCTCA CCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCCATATG AATATCCTCCTTAG
	Oag 30 Ptrc icd R2	nº 2	1194402-1194347	GCCGTTTTGCAGGGTGATCTTCTTGCC TTGTGCCGGAACAACTACTTTACTTTC CAAAGCTGTTTCCTTCTTACCACACAG TATACGAGCCGGATGATTAATCGCCAA CAGCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
*ldh*A	ldhAF (Opg 0013) DldhA F	N°3	1440865-1410786	GAAACTCGCCGTTTATAGCACAAAACA GTACGACAAGAAGTACCTGCAACAGGT GAACGAGTCCTTTGGCTTTGAGCTGGT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG

Gen	Nombres de oligos	SEC ID nº	Homología con la región cromosómica (Ecogene)	Secuencias
	ldhAR (Opg 0014) DldhA R	N°4	1439878-1439958	TTAAACCAGTTCGTTCGGGCAGGTTTC GCCTTTTTCCAGATTGCTTAAGTTTTGC AGCGTAGTCTGAGAAATACTGGTCAGC ATATGAATATCCTCCTTAG
*mgs*A Km	*DmgsAKF*	N°5	1026316-1026245	GCAGGCTTTTTCGGTCTTTATCTTGCA GCGATAAGTGCTTACAGTAATCTGTAG GAAAGTTAACTACGGATGATTCCGGGG ATCCGTCGACCTGCAGTTC
	DmgsAKR	N°6	1025721-1025800	GGATGTGCCGGTGGCGAGAAAACCGT AAGAAACAGGTGGCGTTTGCCACCTGT GCAATATTACTTCAGACGGTCCGCGAG TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
*mgs*A Cm	*Obu 0085 DmgsA F*	N°7	1026273-1026193	GTAATCTGTAGGAAAGTTAACTACGGA TGTACATTATGGAACTGACGACTCGCA CTTTACCTGCGCGGAAACATATTGCGC CATATGAATATCCTCCTTAG
	Obu 0086 DmgsA R	N°8	1025758-1025838	GGCGTTTGCCACCTGTGCAATATTACT TCAGACGGTCCGCGAGATAACGCTGA TAATCGGGGATCAGAATATCGACCGC GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
*arc*A	*Ome 914 DarcAF*	*N°9*	4638322-4638245	CCCCGCACATTCTTATCGTTGAAGACG AGTTGGTAACACGCAACACGTTGAAAA GTATTTTCGAAGCGGAAGGCTATGTGT AGGCTGGAGCTGCTTCG
	ome 915 DarcAR	*N°10*	4637621-4637699	CCAGATCACCGCAGAAGCGATAACCTT CACCGTGAATGGTGGCGATGATTTCC GGCGTATCCGGCGTAGATTCGAAATG CATATGAATATCCTCCTTAG
*glc*A	*DglcA-loxP F Oag 0123 DglcA-loxP F*	*N°11*	3119299-3119221	GGTTACCTGGACCCAAATGTATATGCC GATGGGAGGACTGGGGCTATCCGCTC TGGTCGCCCTGATCCCGATAATATTCA ATTAACCCTCACTAAAGGG
	DglcA-loxP R Oag 0124 DglcA-loxP R	*N°12*	3117622-3117701	CGAGACTAACATCCCGGTAAACACATA CGCCTGCAGCAGGGTGATAATGCCGA TAACGCTGGCAAAAATCAGACTGTGCT AATACGACTCACTATAGGG
*lld*P	*DlldP F Oag 0051 DlldP F*	*N°13*	3775414-3775493	GACCTGCAATGAATCTCTGGCAACAAA ACTACGATCCCGCCGGGAATATCTGG CTTTCCAGTCTGATAGCATCGCTTCCC CATATGAATATCCTCCTTAG
	DlldP R Oag 0052 DlldP R	*N°14*	3777054-3776976	CATAAGCCTGAAGCGTGGTGATCACG CCCACTATACAGGTGAAGATCAGGCTG TGTTTGACAGTAAAGCGGAACAAATCT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG
*yjc*G	*DyjcGF Oag 0133 DyjcGF*	*nº 15*	4282916-4282835	GTTCTGACGGCGCTTGCCGCCACACT CCCTTTCGCAGCTAACGCCGCGGATG CTATTAGCGGGGCCGTAGAGCGCCAG CCAATTAACCCTCACTAAAGGG
	DyjcGR Oag 0134 DyjcGR	*N°16*	4281281-4281360	GCGCGCGGCCTTGCTCAACGCCAAAG CCGGTCTGGGAGCGGATAAACTGCGC GCGGAACAGTTCACGCTCACGCGCGC CTAATACGACTCACTATAGGG
pME101-ycdW-TT7-PaceA-aceA-TT01	*Oag 0033*	*N°17*	1097384-1097416	CCTACCGGTATGGGCGAGCAAATGCA GGAATATGC Parte de ycdW
	Oag 0034	*N°18*	1098047-1098016	GCATGCATCCCGGGGCAGAAAGGCCC ACCCGAAGGTGAGCCAGTGTGAAGAT CTTTAGTAGCCGCGTGCGCGGTCGAC TTGCCCGC Terminal de ycdW + el terminador TT7

Gen	Nombres de oligos	SEC ID nº	Homología con la región cromosómica (Ecogene)	Secuencias
	Oag 0037	*N°19*	4213337-4213361	CCCAAGCTTCATATTGTTATCAACAAGTTATC Promotor aceBAK e inicio de aceA
	Oag 0038	*N°20*	4216438-4216419	TCCCCCGGGGCTTAGAACTGCGATTCTTC Terminal de aceA

Tabla 2

Oligonucleótidos utilizados para comprobar la inserción de un casete de resistencia o la pérdida del casete de resistencia

Gen	Nombres de oligos	SEC ID nº	Homología con la región cromosómica	Secuencias
icd	Ome 704 sec Ptrc-icd F	N°21	1194153-1194173	CAGAGATTATGAATTGCCGCA
	Ome 705 sec Ptrc-icd R	N°22	1194540-1194520	CCAGGAGATTTTACGCTCGCC
*ldh*A	Opg 0011 ldhAF	N°23	1439724-1439743	GCCATCAGCAGGCTTAGCGC
	Opg 0012 ldhAR	N°24	1441029-1441007	GGGTATTGTGGCATGTTTAACCG
*mgs*A Km y Cm	Opg 0122 yccT R	N°25	1026499-1026480	GATGGCAGATGACAGTACGC
	Opg 0123 helD F2	N°26	1025689-1025704	CCCTCTCCCTTTGTGG
*arc*A	Ome 0916 arcAF	N°27	4638746-4638727	CGACAATTGGATTCACCACG
	Ome 0917 arcAR	N°28	4637308-4637328	GCGGTATTGAAAGGTTGGTGC
*glc*A	Oag 0049 glcA F	N°29	3119492-3119473	CGATACTCTGCGTCTGCGTG
	Oag 0050 glcA R	N°30	3117387-3117408	GCAAAAGCAACAGATAGAACGG
*lld*P	Oag 0053 lldP F	N°31	3775227-3775247	CGCTTATCTGACCTCTGGTTC
	Oag 0054 lldR R	N°32	3777257-3777239	GCACGCCTTCACTCACCAG
*yjc*G	Opg 0076 yjcHF	N°33	4283167-4283147	CGGTTTGCCACCATCCTGTCG
	Opg 0077 yjcFR	N°34	4281047-4281066	CGTTAATCAGGCAAAGAGGG

Ejemplo 1

Construcción del plásmido pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01 (figura 2)

El plásmido pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01 se produjo en tres etapas a partir del plásmido pME101-*ycd*W cuya descripción se presenta en las solicitudes de patentes PCT/EP2006/063046 y PCT/EP2007/055625 y a partir del plásmido pJB137-*ace*A.

- La primera etapa fue construir el plásmido pME101-*ycd*W-TT07 mediante la adición de un terminador al terminal de *ycd*W. El terminal del gen *ycd*W se amplificó mediante PCR realizada en el ADN genómico con los oligonucleótidos, incluyendo el TT07 en su secuencia, que se muestran en la tabla 1. El fragmento de PCR digerido con AgeI/SmaI se clonó en el plásmido pME101-*ycd*W cortado por las mismas enzimas de restricción para dirigirse al plásmido pME101-*ycd*W-TT7.

- El plásmido pJB137-*ace*A se produjo clonando un fragmento de PCR en el plásmido pJB137 (EMBL - entrada número U75326) digerido con SmaI/HindIII. El fragmento de PCR se realizó en el ADN genómico a partir de una cepa de MG1655 Δ*ace*B descrita en las solicitudes de patentes PCT/EP2006/063046 y

PCT/EP2007/055625 y oligonucleótidos (Oag0037 y Oag0038) descritos en la tabla 1. El gen *ace*A, como su propio promotor, se amplificó antes de ser clonado en el plásmido.

- La última etapa fue cortar el plásmido pJB137-*ace*A para obtener el fragmento PaceA-aceA-TT01, TT01 siendo el terminador de pJB137. El plásmido pJB137-*ace*A fue cortado con HindIII, tratado con la enzima Klenow y, por último, digerido por la enzima de restricción PstI. El fragmento de ADN resultante se clonó posteriormente en el plásmido pME101-ycdW-TT07 abierto secuencialmente con SmaI y PstI. El plásmido resultante fue el pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01, llamado pAG025.

Ejemplo 2

Construcción de una cepa capaz de producir ácido glicólico mediante fermentación: MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01)

La cepa de *E. coli* MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* se construyó según la descripción presentada en las solicitudes de patentes PCT/EP2006/063046 y PCT/EP2007/055625.

La atenuación de la transcripción de *icd* se realizó mediante la sustitución del promotor natural de *icd* por uno artificial llamado Ptrc50/RBSB/TTG que transporta un casete de resistencia al cloranfenicol en la cepa de *E. coli* MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta.* La construcción se realiza según la técnica descrita en el protocolo 1 con los oligonucleótidos respectivos (SEC ID nº:1 y 2) presentada en la tabla 1. El casete de cloranfenicol no se elimina.

El fragmento de PCR Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* se introdujo en primer lugar por electroporación en la cepa MG1655 (pKD46) para producir la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm,* validada mediante secuenciación.

En una segunda etapa, la atenuación de la construcción de *icd* se introdujo en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* mediante transducción (consulte el protocolo 3) para producir la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta.*

El plásmido pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01 (ejemplo 1) se introdujo posteriormente en la cepa para producir MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01), llamado AG0662.

Ejemplo 3

Construcción de una cepa para mejorar la producción de ácido glicólico mediante fermentación: MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*ldh*A (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01)

El gen *ldh*A se inactivó en la cepa de *E. coli* MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd*::Cm Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* (pKD46) mediante recombinación con un producto de PCR realizado con los oligos nº 3 y nº 4 presentados en la tabla 1 (ver el protocolo 1). La cepa resultante fue la MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd*::Cm Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*ldh*A::Km en la que se introdujo el plásmido pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01 (ejemplo 1) en una última etapa. La cepa final se llamó AG0708.

Ejemplo 4

Construcción de una cepa para mejorar la producción de ácido glicólico mediante fermentación: MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01)

El gen *mgs*A se inactivó en la cepa de *E. coli* MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd*::Cm Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* mediante la técnica de transducción con el fago P1 descrito en el protocolo 3. La cepa donante MG1655 Δ*mgs*A::Km se produjo mediante la introducción de un fragmento de PCR en la cepa MG1655 (pKD46). Los oligonucleótidos utilizados para la construcción se presentan en la tabla 1. La cepa se validó mediante secuenciación.

El plásmido pAG025 se introdujo posteriormente en la cepa de *E. coli* MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd*::Cm Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A::Km para dirigirse a la final, llamada AG0819 : MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd*::Cm Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A::Km (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01).

Ejemplo 5

Construcción de una cepa para mejorar la producción de ácido glicólico mediante fermentación: MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*arc*A (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01)

El gen *arcA* se inactivó en la cepa de *E. coli* MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd*::Cm Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* mediante la técnica de transducción con el fago P1 descrito en el protocolo 3. La cepa donante MG1655 Δ*arc*A::Km se produjo mediante la introducción de un fragmento de PCR en la cepa MG1655 (pKD46). Los oligonucleótidos utilizados para la construcción se presentan en la tabla 1. La cepa se validó mediante secuenciación.

El plásmido pAG025 se introdujo posteriormente en la cepa de *E. coli* MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd*::Cm Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*arc*A::Km para dirigirse a la final, llamada AG0956: MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd*::Cm Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*arc*A::Km (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01).

Ejemplo 6

Construcción de una cepa para mejorar la producción de ácido glicólico mediante fermentación: MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*ldh*A Δ*mgs*A (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01)

En una primera etapa, la deleción de Δ*mgsA*::Cm se realizó mediante transducción con un fago (protocolo 3) en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA*::Cm. La cepa donante MG1655 Δ*mgs*A::Cm se produjo mediante la introducción de un fragmento de PCR en la cepa MG1655 (pKD46). Los oligonucleótidos utilizados para la construcción se presentan en la tabla 1. La cepa se validó mediante secuenciación.

En una segunda etapa, la deleción Δ*ldhA*::Km se realizó en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA::Cm* mediante transducción a partir de la cepa donante MG1655 Δ*ldhA*::Km (descrita en el ejemplo 3) para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA::*Cm Δ*ldhA::*Km. Los casetes de resistencia al cloranfenicol y kanamicina se eliminaron según la técnica descrita en el protocolo 2. La cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA* Δ*ldhA* se validó mediante PCR con los oligos presentados en la tabla 2.

En una tercera etapa, se introdujo la construcción de Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* mediante transducción a partir de la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* descrita en el ejemplo 2. La cepa resultante fue la MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA* Δ*ldhA.*

Finalmente, se introdujo el plásmido pAG25 (ejemplo 1) en la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA* Δ*ldhA* para producir la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA* Δ*ldhA* (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01) llamada AG0873.

Ejemplo 7

Construcción de una cepa para mejorar la producción de ácido glicólico mediante fermentación: MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*ldh*A Δ*mgs*A Δ*arc*A (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01)

La deleción de Δ*arc*A::Km se produjo mediante transducción en la cepa descrita en el ejemplo 6, la MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA* Δ*ldhA,* para producir la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA* Δ*ldhA* Δ*arcA::*Km. La cepa donante MG1655 Δ*arc*A::Km utilizada en el experimento de transducción se describe en el ejemplo 5.

Posteriormente, se introdujo el plásmido pAG25 en la cepa para producir la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgsA* Δ*ldhA* Δ*arcA::Km* (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01) llamada AG1099.

Ejemplo 8

Construcción de una cepa que no puede importar glicolato MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd*::Cm Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*glc*A Δ*lld*P Δ*yjc*G (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01)

En una primera etapa, se introdujo la construcción de Δ*yjc*G::Nm (Cre/lox) en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta (*pKD46) mediante el producto de PCR (consulte el protocolo 4) para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjc*G*::*Nm. Los oligonucleótidos utilizados se presentan en el cuadro 1. La cepa resultante se validó mediante secuenciación.

El casete de resistencia a la neomicina se eliminó según la técnica descrita en el protocolo 5 para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjc*G.

En una segunda etapa, se introdujo la construcción de Δ*glc*A::Nm en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjcG (*pKD46) mediante el producto de PCR (consulte el protocolo 4) para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjcG* Δ*glc*A*::*Nm. Los oligonucleótidos utilizados se presentan en el cuadro 1. La cepa resultante se validó mediante secuenciación.

El casete de resistencia a la neomicina se eliminó según la técnica descrita en el protocolo 5 para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjcG* Δ*glc*A.

En una tercera etapa, se introdujo la deleción de Δ*lld*P::Km en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjcG* Δ*glcA* mediante transducción para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjc*G Δ*glc*A Δ*lld*P*::*Km. La cepa donante MG1655 Δ*lldP*::Km utilizada en el experimento de transducción se produjo mediante recombinación de un fragmento de PCR introducido en un MG1655 (pKD46). Los oligonucleótidos se presentan en el cuadro 1. La cepa MG1655 Δ*lld*P::Km se validó mediante secuenciación.

La siguiente etapa consistió en transducir la atenuación de Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* mediante transducción a partir de la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::*Cm*,* descrita en el ejemplo 2, en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjcG* Δ*glcA* Δ*lldP::*Km para producir la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjc*G Δ*glc*A Δ*lld*P*::*Km.

La última etapa consistió en la introducción del plásmido pAG25 (ejemplo 1) para obtener la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*yjc*G Δ*glc*A Δ*lld*P*::*Km (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01), llamada AG1056.

Ejemplo 9

Construcción de una cepa para mejorar la producción de ácido glicólico mediante fermentación y que no pueda importar glicolato: MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*ldh*A Δ*mgs*A Δ*glc*A Δ*lld*P Δ*yjc*G (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01)

En una primera etapa, se introdujo la construcción de Δ*yjc*G::Nm mediante el producto de PCR (protocolo 4) en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A (pKD46) descrita en el ejemplo 6, para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G*::*Nm.

El casete de resistencia a la neomicina se eliminó según la técnica descrita en el protocolo 5 para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G*.*

En una segunda etapa, se introdujo la deleción de Δ*glc*A::Nm (Cre/lox) mediante el producto de PCR en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G (pKD46) para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G Δ*glc*A*::Nm*.

El casete de resistencia a la neomicina se eliminó según la técnica descrita en el protocolo 5 para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G Δ*glc*A.

La tercera etapa consistió en la introducción de Δ*lld*P::Km mediante transducción a partir de la cepa MG1655 Δ*lldP::K*m, descrita en el ejemplo 8, en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G Δ*glc*A para producir la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd+eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G Δ*glc*A Δ*lld*P*::*Km.

Posteriormente, se transdujo el fragmento Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::*Cm en la cepa MG1655 Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB

Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd*+*eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G Δ*glc*A Δ*lld*P::Km para producir la cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd*+*eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G Δ*glc*A Δ*lld*P::Km. La cepa MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::*Cm descrita en el ejemplo 2 era la cepa donante del experimento de transducción.

Finalmente, se introdujo el plásmido pAG25 en la cepa mediante electroporación para producir la cepa llamada AG0960: MG1655 Ptrc50/RBSB/TTG-*icd::Cm* Δ*ace*B Δ*gcl* Δ*glc*DEFGB Δ*ald*A Δ*icl*R Δ*edd*+*eda* Δ*pox*B Δ*ack*A+*pta* Δ*mgs*A Δ*ldh*A Δ*yjc*G Δ*glc*A Δ*lld*P*::Km* (pME101-*ycd*W-TT07-P*ace*A-*ace*A-TT01).

Los expertos en la materia conocen los procedimientos utilizados para genomanipular un microorganismo y saben que existen diferentes formas de obtener una deleción.

Ejemplo 10

Fermentación de ácido glicólico que produce cepas en matraces de Erlenmeyer

Los rendimientos de las cepas se evaluaron inicialmente en cultivos de matraces de Erlenmeyer con deflectores de 250 ml utilizando un medio modificado M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 32:120-128) complementado con 40 g/l de MOPS y 10 g/l de glucosa y ajustado a un pH de 6,8. Se añadió espectinomicina, en caso de ser necesario, a una concentración de 50 mg/l. Se utilizó un precultivo de 72 horas para inocular un cultivo de 50 ml en $OD_{600\ nm}$ de aproximadamente 0,3. Los cultivos se mantuvieron en un agitador a 30℃ y 200 rpm hasta agotar la glucosa del medio de cultivo. Al final del cultivo, se analizaron la glucosa y el ácido glicólico mediante HPLC utilizando una columna de Biorad HPX 97H para la separación y un refractómetro para la detección.

En la tabla 3 a continuación se presenta la comparación de los rendimientos de las distintas cepas. La cepa descrita en el ejemplo 2 se puede tomar como referencia. Cada valor indica el número de repeticiones (n=1 a n=6).

Tabla 3

Rendimientos de la producción de ácido glicólico de las diferentes cepas descritas anteriormente

Cepa del ejemplo nº.	2	3	4	6	5	7	8	9
Nombre de la cepa	AG0662	AG0708	AG0819	AG0873	AG0956	AG1099	AG1056	AG0960
Producción de ácido glicólico (g/l)	4,01±0,3	4,0±0,3	4,44	4,45	4,36	5,14	2,46	4,37
Rendimiento (g ácido glicólico / g glucosa)	0,38±0,03	0,39±0,04	0,40	0,43	0,40±0,01	0,52	0,40	0,50

Ejemplo 11

Fermentación del ácido glicólico que produce cepas en un fermentador por lotes

Las cepas descritas en los ejemplos anteriores se evaluaron en condiciones de producción en un fermentador de 600 ml utilizando un protocolo por lotes.

Se produjo un precultivo único en una matraz de Erlenmeyer de 500 ml con 50 ml de un medio sintético complementado con 40 g/l de MOPS, 10 g/l de glucosa (el mismo medio utilizado para los cultivos de las matraces) y 10% del medio LB a 30℃ durante 3 días. Este precul tivo se utilizó para la inoculación del fermentador.

El fermentador con 200 ml del medio sintético, complementado con 20 g/l de glucosa y 50 mg/l de espectinomicina, se inoculó a una densidad óptica inicial de aproximadamente 2. El cultivo se realizó a 37℃ con agitac ión e insuflación de aire ajustadas para mantener el oxígeno disuelto con una saturación superior al 30%. El pH se ajustó a 6,8 con adición de la base. El cultivo se realizó en un modo por lotes hasta agotar la glucosa. En ese momento, se añadió una solución de 700 g/l de glucosa complementada con sulfato de magnesio, oligoelementos y espectinomicina (pulso de glucosa) para recuperar una concentración de 20 g/l de glucosa en el medio. Después del 5^{to} pulso del cultivo, el pH se ajusta a 7,4 hasta el final del cultivo.

Con frecuencia, la cepa descrita en el ejemplo 5 proporcionó mejores rendimientos de producción en el fermentador que la cepa de referencia descrita en el ejemplo 2.

A continuación se presenta una evolución temporal representativa de fermentación para la producción de ácido

glicólico utilizando una cepa del ejemplo 5 (AG0956).

Tabla 5

Evolución temporal representativa de fermentación para la producción de ácido glicólico mediante la cepa AG0956 en un fermentador Multifors (600 mL)

Tiempo (h)	$OD_{600\ nm}$ (AU)	Glucosa (g/l)	Ácido glicólico (g/l)
0,0	1,8	17,4	0,4
15,33	35,3	12,3	16,9
17,83	49,4	12,7	23,7
20,33	58,6	11,9	28,9
22,83	63,6	12,4	33,3
25,33	60,4	12,2	39,7
30,92	58,2	11,0	47,1
39,33	52,0	0,0	52,2

El título final obtenido fue 52,2 g/l de ácido glicólico con un rendimiento de la glucosa de 0,38 g/g y una productividad de 1,33 g/l/h.

Citas

- WO 2007/140816
- WO 2007/141316
- Nunez *et al.,* (2001) Biochemistry, 354, 707-715
- Neidhardt, F. C. (Ed. in Chief), R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. E. Umbarger (eds). 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology.
- WO 2008/0134051A1
- US 2007/116852A1
- WO 2004/033646A2
- WO 2008/116852A1
- Iuchi y Lin, 1988, PNAS; 85: 1888-1892
- Liu y DeWulf 2004, *J Biol Chem*, 279:12588-12597
- Lynch y Lin, 1996 Responses to molecular oxygen; in Neidhardt FC, Curtiss III RJ, Ingraham L, Lin ECC, Low KB, Magasanik BW, Zeznikoff S, Riley M, Schaechter M, Umbarger HE (eds) Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology, ed 2. Washington, American Society for Microbiology, 1996, vol 1, pág. 1526-1538.
- Shalel-Levanon *et al., Biotechnol. Bioeng*. 2005a; 89:556-564
- Shalel-Levanon *et al., Biotechnol. Bioeng*. 2005b; 92:147-159
- Aleexeva *et al.*, 2003, *J. Bacteriol*. 185:204-209
- *J. Bacteriol*. 2005, 187:3171-3179
- US 2006/0073577A1
- WO 2006/020663
- WO 2008/116848
- EP 1 382 686 A1

- WO 2004/033646
- Nunez, F. *et al.*, 2001 *Microbiology*, 147, 1069-1077
- Nunez, F. *et al.,* 2002 *Biochem. And Biophysical research communications* 290, 824-829
- Gimenez, R. *et al.*, 2003 *J. of Bacteriol*. 185, 21, 6448-6455
- Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2da ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York.).
- Carrier y Keasling (1998) *Biotechnol. Prog*. 15, 58-64
- Laporte DC 1989, *Biochimie* Sep-Oct; 71(9-10):1051-7
- Ikeda TP, 1992, *J Bacteriol.* Feb;174(4):1414-6.
- Cozzone AJ, El-Mansi M. 2005, *J Mol Microbiol Biotechnol.* 9(3-4):132-46)
- Georgellis *et al.*, 1999
- Iuchi, S. y Lin, E. C. C. (1993) *Mol. Microbiol*. 9, 9-15
- Bauer, C. E., Elsen, S. y Bird, T. H. (1999) *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 495-523
- S. Iuchi *et al.,* (1991) *Cell*, 66, 5-7
- Jeong, J-Y. *et al.*, 2004, *Journal of Bio. Chem*
- Laub, M. T. y Goulian, M. *Annu. Rev. Genet.* (2007); 41:121-45
- Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000)
- Palmeros B. *y col* (2000), *Gene* 247: 255-264
- Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 32:120-128

Listado de secuencias

<110> METABOLIC EXPLORER
DISCHERT, Wanda
SOUCAILLE, Philippe

<120> PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA CANTIDAD ELEVADA DE ÁCIDO GLICÓLICO MEDIANTE FERMENTACIÓN

<130> D27110

<150> EP 09155971.6
<151> 2009-03-24

<150> US 61/162.712
<151> 2009-03-24

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 119
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 1

ggacgcaaac gcatatgcaa cgtggtggca gacgagcaaa ccagtagcgc tcgaaggaga 60
ggtgatcaca ctggctcacc ttcgggtggg cctttctgcc atatgaatat cctccttag 119

<210> 2
<211> 134
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 2

gccgttttgc agggtgatct tcttgccttg tgccggaaca actactttac tttccaaagc 60
tgtttccttc ttaccacaca gtatacgagc cggatgatta atcgccaaca gctctgtagg 120
ctggagctgc ttcg 134

<210> 3
<211> 100
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 3

gaaactcgcc gtttatagca caaaacagta cgacaagaag tacctgcaac aggtgaacga 60
gtcctttggc tttgagctgg tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 4
<211> 101
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 4

ttaaaccagt tcgttcgggc aggtttcgcc tttttccaga ttgcttaagt tttgcagcgt 60
agtctgagaa atactggtca gcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 5
<211> 100
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 5

gcaggctttt tcggtcttta tcttgcagcg ataagtgctt acagtaatct gtaggaaagt 60
taactacgga tgattccggg gatccgtcga cctgcagttc 100

<210> 6
<211> 100
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 6

ggatgtgccg gtggcgagaa aaccgtaaga aacaggtggc gtttgccacc tgtgcaatat 60
tacttcagac ggtccgcgag tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 7
<211> 101
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 7

gtaatctgta ggaaagttaa ctacggatgt acattatgga actgacgact cgcactttac 60
ctgcgcggaa acatattgcg ccatatgaat atcctcctta g 101

<210> 8
<211> 100
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 8

ggcgtttgcc acctgtgcaa tattacttca gacggtccgc gagataacgc tgataatcgg 60
ggatcagaat atcgaccgcg tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 9
<211> 98
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 9

ccccgcacat tcttatcgtt gaagacgagt tggtaacacg caacacgttg aaaagtattt 60
tcgaagcgga aggctatgtg taggctggag ctgcttcg 98

<210> 10
<211> 99
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 10

ccagatcacc gcagaagcga taaccttcac cgtgaatggt ggcgatgatt tccggcgtat 60
ccggcgtaga ttcgaaatgc atatgaatat cctccttag 99

<210> 11
<211> 99
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 11

ggttacctgg acccaaatgt atatgccgat gggaggactg gggctatccg ctctggtcgc 60
cctgatcccg ataatattca attaaccctc actaaaggg 99

<210> 12
<211> 99
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 12

cgagactaac atcccggtaa acacatacgc ctgcagcagg gtgataatgc cgataacgct 60
ggcaaaaatc agactgtgct aatacgactc actataggg 99

<210> 13
<211> 100
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 13

gacctgcaat gaatctctgg caacaaaact acgatcccgc cgggaatatc tggctttcca 60
gtctgatagc atcgcttccc catatgaata tcctccttag 100

<210> 14
<211> 99
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 14

cataagcctg aagcgtggtg atcacgccca ctatacaggt gaagatcagg ctgtgtttga 60
cagtaaagcg gaacaaatct gtaggctgga gctgcttcg 99

<210> 15
<211> 100
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 15

gttctgacgg cgcttgccgc cacactccct ttcgcagcta acgccgcgga tgctattagc 60
ggggccgtag agcgccagcc aattaaccct cactaaaggg 100

<210> 16
<211> 99
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 16

gcgcgcggcc ttgctcaacg ccaaagccgg tctgggagcg gataaactgc gcgcggaaca 60
gttcacgctc acgcgcgcct aatacgactc actataggg 99

<210> 17
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 17

cctaccggta tgggcgagca aatgcaggaa tatgc 35

<210> 18
<211> 86
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 18

gcatgcatcc cggggcagaa aggcccaccc gaaggtgagc cagtgtgaag atctttagta 60
gccgcgtgcg cggtcgactt gcccgc 86

<210> 19
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 19

cccaagcttc atattgttat caacaagtta tc 32

<210> 20
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 20

tcccccgggg cttagaactg cgattcttc 29

<210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 21

cagagattat gaattgccgc a 21

<210> 22
<211> 21

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 22

ccaggagatt ttacgctcgc c 21

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 23

gccatcagca ggcttagcgc 20

<210> 24
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 24

gggtattgtg gcatgtttaa ccg 23

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 25

gatggcagat gacagtacgc 20

<210> 26
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 26

ccctctccct ttgtgg 16

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 27

cgacaattgg attcaccacg 20

<210> 28
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 28

gcggtattga aaggttggtg c 21

<210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 29

cgatactctg cgtctgcgtg 20

<210> 30
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 30

gcaaaagcaa cagatagaac gg 22

<210> 31
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 31

cgcttatctg acctctggtt c 21

<210> 32
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 32

gcacgccttc actcaccag 19

<210> 33
<211> 21

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 33

cggtttgcca ccatcctgtc g 21

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 34

cgttaatcag gcaaagaggg 20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción fermentativa de ácido glicólico, sus derivados o precursores, mediante el cultivo de un microorganismo modificado en un medio de cultivo adecuado que comprende una fuente de carbono y la recuperación del ácido glicólico del medio de cultivo, en el que dicho microorganismo modificado es una bacteria gramnegativa modificada genéticamente para la producción de ácido glicólico que comprende además una atenuación del gen *mgsA* y una atenuación del gen *IdhA.*

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo modificado inicialmente para producir ácido glicólico comprende además por lo menos una de las modificaciones siguientes:

- atenuación del gen *arcA,*
- atenuación de por lo menos uno de los genes *glcA, lldP* e *yjcG,*

y sus combinaciones.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el microorganismo modificado inicialmente para producir ácido glicólico comprende por lo menos una de las modificaciones siguientes:

- atenuación de la conversión del glioxilato en productos distintos de glicolato (atenuación de *ace*B, *glc*B, *gcl*, *eda*)
- no puede metabolizar sustancialmente el glicolato (atenuación de *glc*DEFG, *aldA*)
- aumento del flujo de la vía del glioxilato (atenuación de *icd, aceK*, *pta, ackA, pox*B, *iclR o fadR* y/o sobreexpresión de *aceA*)
- aumento de la conversión del glioxilato en glicolato (sobreexpresión de *ycdW*)
- aumento de la disponibilidad de NADPH (atenuación de *pgi, udh*A, *edd).*

4. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, en el que los tres genes *glcA, lldP* e *yjcG* son atenuados.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la fuente de carbono es seleccionada de entre el grupo que consiste en glucosa, sacarosa, fructosa, manosa, xilosa, arabinosa o galactosa, celobiosa, almidón o sus derivados, glicerol y sustratos de carbono único siendo producido el ácido glioxílico.

6. Procedimiento para la preparación fermentativa del glicolato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas siguientes:

a) fermentar el microorganismo modificado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, modificado inicialmente para producir glicolato,

b) concentrar el glicolato en dicho microorganismo o en el medio, y

c) aislar el ácido glicólico del caldo de fermentación y/o la biomasa restante opcionalmente en partes o en la cantidad total (0 a 100%) en el producto final.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que se aísla el glicolato mediante una etapa de polimerización a por lo menos dímeros de glicolato.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el glicolato se recupera mediante la despolimerización a partir de dímeros, oligómeros y/o polímeros de glicolato.

9. Microorganismo modificado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

10. Microorganismo según la reivindicación 11, en el que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*.

11. Microorganismo según la reivindicación 12, en el que pertenece al género *Escherichia*.

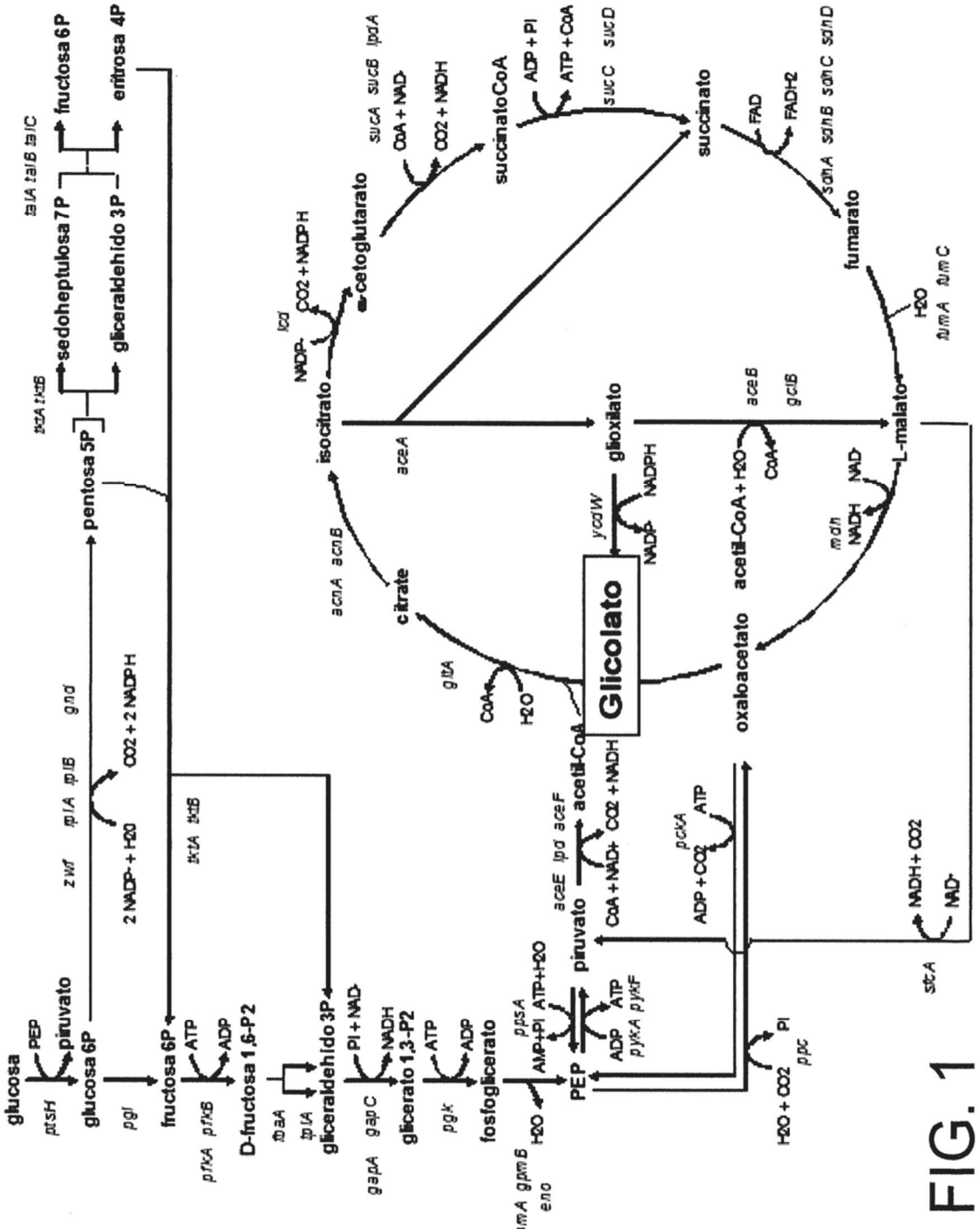
glucosa
ptsH
PEP
piruvato
glucosa 6P
pgl
zwf
gnd
2 NADP+ + H2O
CO2 + 2 NADPH
pentosa 5P
tktA tktB
sedoheptulosa 7P
fructosa 6P
eritrosa 4P
talA talB talC
fructosa 6P
pfkA pfkB
ATP
ADP
D-fructosa 1,6-P2
fbaA
tpiA
gliceraldehido 3P
gapA gapC
PI + NAD
NADH
glicerato 1,3-P2
pgk
ATP
ADP
fosfoglicerato
gpmA gpmB eno
H2O
ppsA
AMP+PI ATP+H2O
PEP
piruvato
aceE lpd aceF
CoA +NAD+ CO2 +NADH
acetil-CoA
pykA pykF
ADP ATP
pckA
ADP + CO2 ATP
oxaloacetato
H2O + CO2 PI
ppc
citrato
gltA
CoA
H2O
acnA acnB
isocitrato
icd
NADP+
CO2 +NADPH
cetoglutarato
sucA sucB lpdA
CoA + NAD+
CO2 + NADH
succinatoCoA
ADP + PI
ATP + CoA
succ sucD
succinato
FAD
FADH2
sdhA sdhB sdhC sdhD
fumarato
fumA fumC
H2O
L-malato
mdh
NADH
NAD+
aceA
glioxilato
NADPH
NADP+
ycdW
aceB
glcB
acetil-CoA + H2O
CoA
Glicolato
NADH+ CO2
NAD+
sfcA

FIG. 1

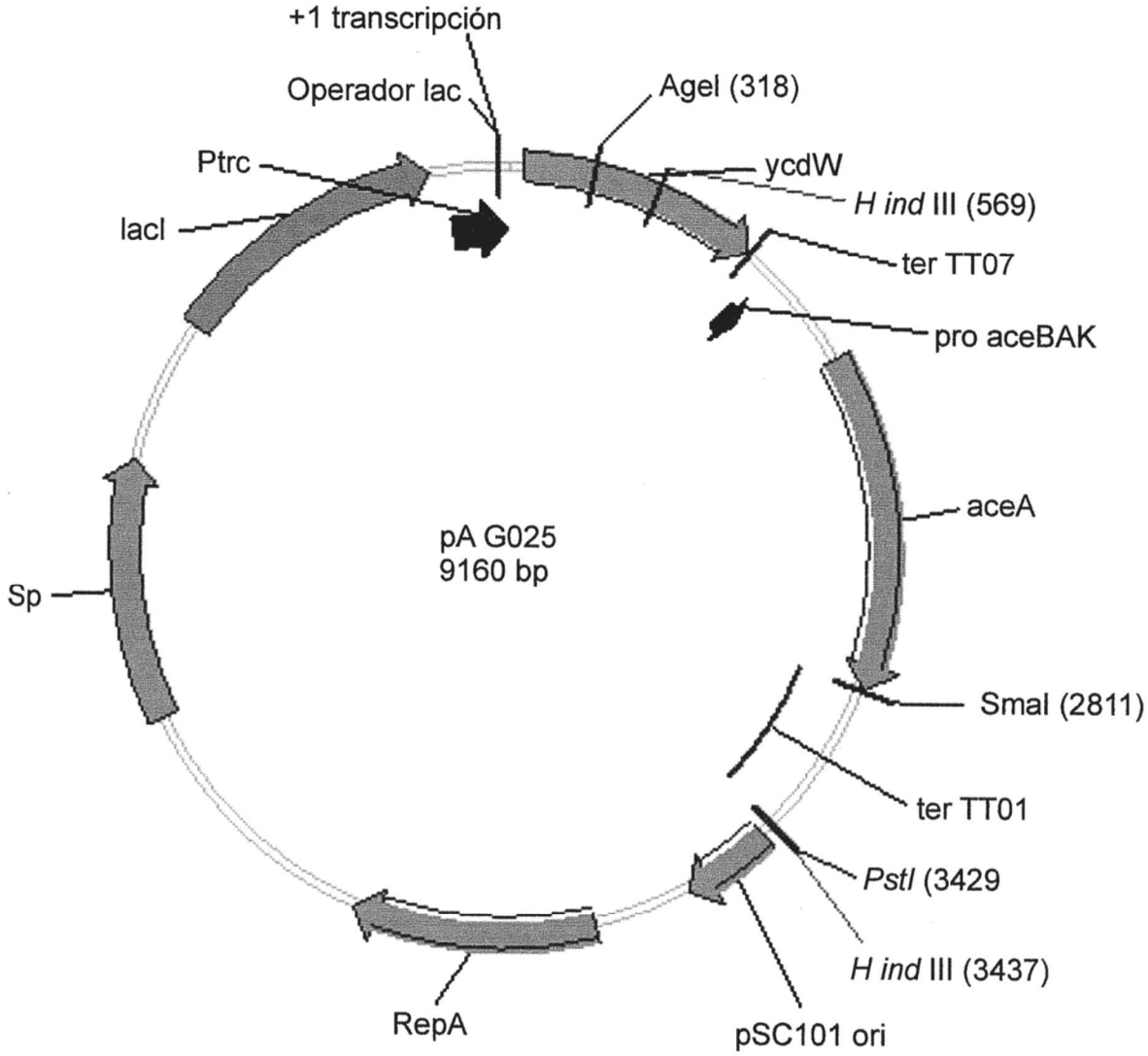
+1 transcripción
Operador lac
AgeI (318)
Ptrc
ycdW
H ind III (569)
lacI
ter TT07
pro aceBAK
aceA
pA G025
9160 bp
Sp
SmaI (2811)
ter TT01
PstI (3429
H ind III (3437)
RepA
pSC101 ori

FIG. 2

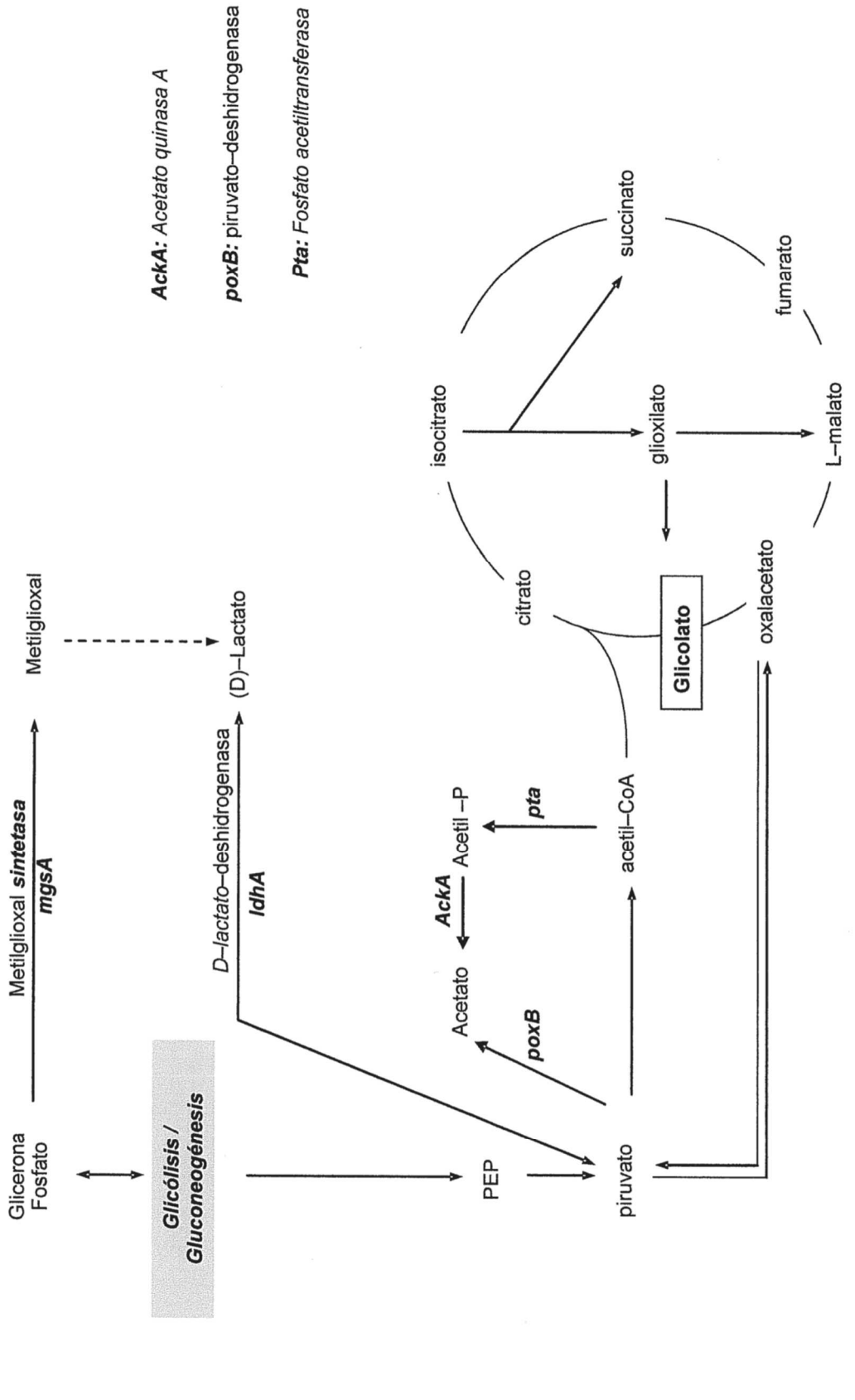

FIG. 3

PEP: fosfoenolpiruvato