

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 671**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2009 PCT/US2009/038158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09120730**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2009 E 09725976 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2271755**

54 Título: **Promotores de Zymomonas de alta expresión**

30 Prioridad:

27.03.2008 US 39871

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

31.07.2017

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(50.0%)
1007 Market Street
Wilmington, DE 19898, US y
ALLIANCE FOR SUSTAINABLE ENERGY, LLC
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**VIITANEN, PAUL, V.;
TAO, LUAN;
ZHANG, YUYING;
CAIMI, PERRY, G.;
MCCUTCHEN, CAROL;
MCCOLE, LAURA;
ZHANG, MIN;
CHOU, YAT-CHEN y
FRANDEN, MARY, ANN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 627 671 T3

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

Promotores de *Zymomonas* de alta expresión

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente U.S. No. 61/039871 presentada el 27 de Marzo de 2008.

Declaración de derechos del gobierno

Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos bajo los Contratos Nos. 04-03-CA-70224 y DE-FC36-03GO13146 otorgados por el Departamento de Energía. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención. Además, el gobierno de los Estados Unidos tiene derechos en esta invención bajo el Contrato No. DE-AC36-99GO10337 entre el Departamento de Energía de los Estados Unidos y el Laboratorio Nacional de Energía Renovable, una división del Instituto de Investigación del Medio Oeste.

Campo de la Invención

La invención se refiere a los campos de microbiología e ingeniería genética. Más específicamente, se identificaron nuevos promotores para dirigir la expresión de genes quiméricos en bacterias.

Antecedentes de la invención

La producción de etanol por microorganismos proporciona una fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles y es por lo tanto un área importante de investigación actual. Se desea que los microorganismos que producen etanol, así como otros productos útiles, sean capaces de utilizar xilosa como una fuente de carbono ya que la xilosa es la pentosa mayoritaria en materiales lignocelulósicos hidrolizados, y puede proporcionar por tanto un sustrato de carbono abundantemente disponible y de bajo costo. *Zymomonas mobilis* y otros etanológenos bacterianos que no utilizan naturalmente xilosa pueden ser modificados genéticamente para la utilización de xilosa mediante la introducción de genes que codifican 1) xilosa isomerasa, que cataliza la conversión de xilosa a xilulosa; 2) xilulocinasa, que fosforila la xilulosa para formar xilulosa 5-fosfato; 3) transcetolasa; y 4) transaldolasa.

El gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa se aisló a partir de una librería de fragmentos de DNA de *Zymomonas mobilis* al complementar una cepa deficiente de *Escherichia coli*. Contuvo promotores en tándem que fueron reconocidos por *E. coli* pero parecían funcionar menos eficazmente que el promotor entérico de *lac* en *E. coli* (Conway y colaboradores. *Journal of Bacteriology*, American Society for Microbiology, US, Vol. 169, no. 12, 1 Diciembre 1987). Ha habido éxito en la ingeniería de cepas de *Z. mobilis* para el metabolismo de la xilosa (Documentos de Patente US 5514583, US 5712133, US 6566107, WO 95/28476, Feldmann y colaboradores. (1992) *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 354-361, Zhang y colaboradores. (1995) *Science* 267: 240-243), así como una cepa de *Zymobacter palmae* (Yanase y colaboradores. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2592-2599). Sin embargo, típicamente las cepas modificadas no crecen y producen etanol tanto en xilosa como en glucosa. Para esta modificación, los genes que codifican las proteínas heterólogas para el metabolismo de xilosa se han expresado a partir de promotores que son activos en células de *Z. mobilis*, típicamente el promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* o el promotor del gen enolasa de *Z. mobilis*. Las cepas modificadas para la utilización de xilosa se han adaptado mediante un paso en serie sobre un medio de xilosa, dando como resultado cepas con utilización de xilosa mejorada como se describe en el Documento de Patente U.S.Pat. 7,223,575 y la solicitud de Patente de propiedad común y en trámite U.S. No. US20080286870. Sin embargo las bases genéticas para la mejora no se han determinado.

Sigue existiendo la necesidad de cepas genéticamente modificadas de *Zymomonas*, y otros etanológenos bacterianos, que tengan una utilización de la xilosa mejorada. Los solicitantes han descubierto promotores mutantes que tienen una actividad aumentada que se pueden utilizar para expresar genes de utilización de xilosa, actividad que confiere a las cepas modificadas que comprenden estos promotores la utilización de xilosa mejorada. Los promotores se pueden utilizar para la expresión de otros genes.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a promotores mutantes aislados para la expresión de genes, es decir, genes quiméricos en *Zymomonas*, *Zymobacter*, y bacterias relacionadas que dirigen niveles más altos de expresión génica que los niveles dirigidos por el promotor natural del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* (Pgap). Los promotores mutantes son derivados del promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y tienen una actividad aumentada debido a la presencia de mutaciones específicas. Los promotores se pueden utilizar en modificaciones genéticas para la expresión de una región codificante o de un RNA regulador. La expresión de una región codificante para la xilosa isomerasa dirigida por estos promotores condujo a un crecimiento mejorado de *Zymomonas mobilis* que utilizan xilosa en el medio que contiene xilosa.

- Se describe aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* que tiene una sustitución de nucleótidos en una posición seleccionada de un grupo que consiste en la posición -190, la posición -89, o ambas posiciones -190 y -89; en donde los números de posición son con respecto al codón de iniciación de traducción ATG natural para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en las cepas CP4 y ZM4 de *Z. mobilis*.
- También se describe aquí lo siguiente: un gen quimérico que comprende la molécula de ácido nucleico aislada descrita anteriormente y unida operativamente a una molécula de ácido nucleico heteróloga; un vector que comprende la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente y un método de modificación genética de una célula bacteriana que comprende introducir en la célula la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente.
- 10 Breve descripción de las figuras y descripciones de las secuencias**
- Las diversas realizaciones de la invención se pueden entender más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada, las figuras, y las descripciones de las secuencias adjuntas, que forman una parte de esta solicitud.
- La Figura 1 muestra las estrategias para los ensayos enzimáticos de transcetolasa (A), transaldolasa (B), xilosa isomerasa (C), y xilulocinasa (D).
- 15 La Figura 2 muestra una gráfica de las actividades de la xilosa isomerasa (XI) y xilulocinasa (XK) en las líneas T2C, T3C, T4C, y T5C transformadas con *PgapxylAB*.
- La Figura 3 muestra una gráfica de las actividades de la transaldolasa (TAL) y transcetolasa (TKT) en las líneas T2C, T3C, T4C y T5C transformadas con *PgapxylAB*.
- La Figura 4 muestra una gráfica del % de rendimiento teórico de etanol y del % de utilización de xilosa de colonias de cepas adaptadas seleccionadas que utilizan xilosa.
- 20 La Figura 5 muestra una gráfica del crecimiento de cepas adaptadas que utilizan xilosa a 70 h en RM (medio rico) con un 5% de xilosa (RMX5%) antes y después de crecer 50 generaciones en RM con 5% de glucosa (RMG).
- La Figura 6 muestra los mapas de plásmidos de (A) pZB188; (B) pZB188/aadA; y (C) pZB188/aadA-GapXylA; así como (D) una representación esquemática del casete de expresión *PgapXylA* de la xilosa isomerasa de *E. coli*.
- 25 La Figura 7 muestra los mapas de plásmidos de (A) pMODTM-2-<MCS>; (B) pMOD- enlazador; y (C) pMOD-enlazador-Spec.
- La Figura 8 muestra el mapa del plásmido de pLDHSp-9WW.
- La Figura 9 muestra el mapa del plásmido del pMOD-enlazador-Spec-801GapXylA.
- 30 La Figura 10 muestra los mapas de plásmidos (A) pMOD-enlazador-Spec-801 GapXylA; (B) pZB188/aadA-GapXylA; y (C) pZB188/aadA-801GapXylA.
- La Figura 11 muestra una gráfica de las curvas de crecimiento (OD600 frente al tiempo) en medios que contienen xilosa para las tres cepas que albergan el plásmido de expresión *Pgap* de la xilosa isomerasa de *E. coli* (X1, X2 y X2) y las tres cepas que albergan el plásmido de control (C1, C2 y C3).
- 35 La Figura 12 muestra la gráfica de las curvas de crecimiento (OD600 versus tiempo) de las cepas ZW641, ZW658, X1 y C1 en medios que contienen xilosa sin espectinomicina trazada en (A) en una escala lineal, y en (B) en una escala logarítmica.
- La Figura 13 muestra las gráficas de las curvas de crecimiento (OD600 versus tiempo) de tres cepas con 801*Pgap-XylA* integrado (#8-2, #8-4, #8-5) y de tres cepas con 641*Pgap-XylA* integrado (#6-1, #6-3, #6-5) comparado con la cepa ZW658, trazado en (A) en una escala lineal, y en (B) en una escala logarítmica.
- 40 La Figura 14 muestra el mapa de un plásmido de pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL.
- La Figura 15 muestra los mapas de plásmidos de (A) pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL; (B) pZB188aadA-641 GapRPI; y (C) pZB188aadA-801GapRPI.
- La Figura 16 muestra un gel de proteína teñido de las proteínas de células enteras a partir de cepas con diferentes promotores que expresan RPI.
- 45 La invención se puede comprender más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada y de las descripciones de las secuencias adjuntas que forman parte de esta solicitud.
- Las siguientes secuencias se ajustan a 37 C.F.R.1.821-1.825 ("Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures – the Sequence Rules") y son consecuentes con la norma ST.25 (1998) de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO) y los requisitos del listado de

ES 2 627 671 T3

secuencias de la EPO y PCT (Normas 5.2 y 49.5 (a.bis), y la Sección 208 y Anexo C de las instrucciones administrativas). Los símbolos y el formato utilizado para los datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las normas expuestas en 37 C.F.R. §1.822.

SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótidos de la *ZmPgap* de la cepa CP4 de *Z. mobilis*.

5 SEQ ID NO:2 es la secuencia de nucleótidos de la *ZmPgap* de la cepa ZM4 de *Z. mobilis*.

SEQ ID NO:3 es la secuencia de nucleótidos de la *ZmPgap* de pZB4, que está también en el operón *PgapxyIAB* de las cepas ZW641 y 8XL4.

SEQ ID NO:4 es la secuencia de nucleótidos del *Pgap* mejorado de la cepa ZW658.

SEQ ID NO:5 es la secuencia de nucleótidos del *Pgap* mejorado de la cepa 8b.

10 SEQ ID NO:6 es la secuencia de nucleótidos del *Pgap* mejorado con ambas mutaciones en -190 (ZW658) y -89 (8b) en la variante pZB4 de *Pgap*.

SEQ ID NO:7 es la secuencia de nucleótidos del *Pgap* mejorado con la mutación en -190 de ZW658 en la variante CP4 de *Pgap*.

15 SEQ ID NO:8 es la secuencia de nucleótidos del *Pgap* mejorado con la mutación en -89 de 8b en la variante CP4 de *Pgap*.

SEQ ID NO:9 es la secuencia de nucleótidos del *Pgap* mejorado con ambas mutaciones en -190 (ZW658) y -89 (8b) en la variante CP4 de *Pgap*.

SEQ ID NO:10 es la secuencia de nucleótidos del *Pgap* mejorado con la mutación en -190 de ZW658 en la variante ZM4 de *Pgap*.

20 SEQ ID NO:11 es la secuencia de nucleótidos del *Pgap* mejorado con la mutación en -89 de 8b en la variante ZM4 de *Pgap*.

SEQ ID NO:12 es la secuencia de nucleótidos del *Pgap* mejorado con ambas mutaciones en -190 (ZW658) y -89 (8b) en la variante ZM4 de *Pgap*.

25 SEQ ID NOS:13 y 14 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de un fragmento de DNA que contiene el promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Pgap*) del pZB4.

SEQ ID NOS:15 y 16 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de un fragmento de DNA que contiene una región codificante *tal* del pZB4.

SEQ ID NOS:17 y 18 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de un fragmento de DNA que contiene *Pgaptal* del *Pgap* y fragmentos *tal*.

30 SEQ ID NOS:19 y 20 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de un fragmento de DNA que contiene *loxP::Cm* del pZB186.

SEQ ID NO:21 es la secuencia de nucleótidos completa para el plásmido pMODP*gaptalktCm*.

SEQ ID NOS:22 y 23 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de un fragmento de DNA de 3 kb que contiene las regiones codificantes *tal* y *tkl* en transformantes que reciben pMODP*gaptalktCm*.

35 SEQ ID NO:24 es la secuencia de nucleótidos completa para el plásmido pMODP*gapxyIABC*.

SEQ ID NOS:25 y 26 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de un fragmento *PgapxyIA* de DNA de 1,6 kb de los integrantes T2C, T3C, T4C y T5C con pMODP*gapxyIABCm*.

SEQ ID NOS:27 y 28 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de un fragmento de DNA que contiene la *Pgap* de ZW641 y ZW658.

40 SEQ ID NOS:29-31 son las secuencias de nucleótidos para los cebadores para secuenciar el *Pgap* de ZW641 y ZW658.

SEQ ID NOS:32 y 33 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de un fragmento de DNA que contiene un casete Spec^r.

SEQ ID NO:34 es la secuencia de nucleótidos completa del casete de expresión *PgapXylA* de la xilosa isomerasa.

SEQ ID NOs:35 y 36 son las secuencias de nucleótidos de oligonucleótidos utilizadas para sustituir un sitio de multi-clonación diferente en pMOD2-<MCS>.

5 SEQ ID NOs:37 y 38 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de las regiones *PgapXylA* de las cepas ZW801-4 y ZW641 para la inserción en pMOD-enlazador-Spec para rendir plásmidos PMOD-espaciador-Spec-801 *GapXylA* y pMOD-espaciador-Spec-641 *GapXylA*, respectivamente.

SEQ ID NOs:39 y 40 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de *Pgap* de pZB188/aadA-641 *GapXylA* y que incluyen las 15 primeras bp del marco de lectura abierto RPI de *Z. mobilis*.

SEQ ID NOs:41 y 42 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación del marco de lectura abierto RPI de *Z. mobilis*.

10 SEQ ID NO:43 es la secuencia de nucleótidos completa del casete de expresión RPI que está en el plásmido pZB188aadA/*Gap/Zymo RPI/EcoliSL*.

SEQ ID NOs:44 y 45 son las secuencias de nucleótidos de los cebadores para la amplificación de un fragmento de DNA que contiene el *Pgap* de 8XL4 y 8b.

SEQ ID NO:46 es la secuencia de nucleótidos de un cebador para secuenciar el *Pgap* de 8XL4 y 8b.

15 SEQ ID NO:47 es la secuencia de nucleótidos de una parte de *ZmPgap* de CP4, ZM4, y pZB4 con SEQ ID Nos:1, 2, y 3, respectivamente, que contiene la posición -190.

SEQ ID NO:48 es la secuencia de nucleótidos de una parte de *ZmPgap* de CP4, ZM4, y pZB4 con SEQ ID Nos:1, 2, y 3, respectivamente, que contiene la posición -89.

Descripción detallada de la invención

20 Se describen aquí nuevos promotores que se pueden utilizar par la expresión de genes quiméricos en células bacterianas. Los solicitantes han descubierto que cada una de las dos mutaciones diferentes del promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* incrementan por separado el nivel de expresión dirigido por el promotor. Una mutación está en la posición -190, y la segunda mutación está en la posición -89, ambas con respecto al codón de iniciación de traducción ATG natural para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en las cepas CP4 y ZM4 de *Z. mobilis*.
25 Un promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* que contiene una o ambas de estas mutaciones se puede utilizar para la expresión de heterólogos, operativamente unido a secuencias de DNA en células bacterianas.

Las siguientes abreviaciones y definiciones se utilizarán para la interpretación de la especificación y de las reivindicaciones.

30 Como se usa aquí, los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”, “que tiene”, “contiene”, o “que contiene”, o cualquier otra variación de los mismos, se destinan a cubrir una inclusión no exclusiva. Por ejemplo, una composición, una mezcla, procedimiento, método, artículo, o aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente a esos elementos solamente sino que pueden incluir otros elementos no listados expresamente o inherentes a tal composición, mezcla, procedimiento, método, artículo, o aparato. Además, a menos que se indique explícitamente lo contrario, “o” se refiere a un inclusivo o y no un exclusivo o. Por ejemplo, una condición A o B se satisface por una cualquiera de las siguientes: A es verdadera (o presente) y B es falsa (o no presente), A es falsa (o no presente) y B es verdadera (o presente), y ambos A y B son verdaderas (o presentes).
35

Además, los artículos indefinidos “un” y “un” que preceden a un elemento o componente de la invención están destinados a no ser restrictivos con respecto al número de instancias (es decir, ocurrencias) del elemento o componente. Por tanto “un” o “un” se debería leer para incluir uno o al menos uno, y la forma de palabra singular del elemento o componente incluye también el plural a menos que el número esté, obviamente, destinado a ser singular.
40

“Gen” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica o una molécula de RNA funcional, que puede incluir secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificantes) y que siguen (secuencias 3' no codificantes) a la secuencia codificante. “Gen nativo” o “gen de tipo nativo” se refieren a un gen que se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. “Gen quimérico” se refiere a cualquier gen que no sea un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. De acuerdo con esto, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la encontrada en la naturaleza. “Gen endógeno” se refiere a un gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo. Un gen “extraño” se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo huésped, pero que se introducen en el organismo huésped por transferencia genética. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos.
45
50

5 El término “construcción genética” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que codifica la expresión de una o más proteínas específicas o moléculas de RNA funcionales. En la construcción genética el gen puede ser nativo, quimérico, o de naturaleza extraña. Típicamente una construcción genética comprenderá una “secuencia codificante”. Una “secuencia codificante” se refiere a una secuencia de DNA que codifica una secuencia de aminoácidos específica.

10 “Promotor” o “regiones de control de la iniciación” se refieren a una secuencia de DNA capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o RNA funcional. En general, una secuencia codificante se localiza en 3’ con respecto a la secuencia del promotor. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de DNA sintético. Los expertos en la técnica entenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones medioambientales. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de tipos de células en la mayoría de los casos se denominan normalmente “promotores constitutivos”.

15 El término “expresión”, como se utiliza aquí, se refiere a la transcripción y acumulación estable de RNA codificante (mRNA) o RNA funcional derivado de un gen. La expresión también puede referirse a la traducción de mRNA en un polipéptido. La “inhibición antisentido” se refiere a la producción de transcritos de RNA antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína objetivo. La “sobreexpresión” se refiere a la producción de un producto génico en organismos transgénicos que excede los niveles de producción en organismos normales o no transformados. La “co-supresión” se refiere a la producción a la producción de transcritos de RNA con sentido o fragmentos capaces de suprimir la expresión de genes extraños o endógenos idénticos o sustancialmente similares (Documento de Patente U.S. 5,231,020).

20 El término “RNA mensajero (mRNA)” como se utiliza aquí, se refiere al RNA que no tiene intrones y que puede traducirse en proteína por la célula.

25 El término “transformación” como se utiliza aquí, se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en un organismo huésped, dando como resultado una herencia genéticamente estable. El ácido nucleico transferido puede estar en forma de un plásmido mantenido en la célula huésped, o algunos de los ácido nucleicos transferidos pueden estar integrados en el genoma de la célula huésped. Los organismos huéspedes que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos “transgénicos” o “recombinantes” o “transformados”.

30 Los términos “plásmido” y “vector” como se utilizan aquí, se refieren a un elemento cromosómico adicional que lleva a menudo genes que no forman parte del metabolismo central de la célula, y normalmente en forma de moléculas circulares de DNA de doble cadena. Dichos elementos pueden ser secuencias de replicación automática, secuencias de genomas de integración, secuencias de fagos o nucleótidos, lineares o circulares, de DNA o RNA de cadena sencilla o doble cadena, derivados de cualquier fuente, en los que un número de secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única que es capaz de introducir un fragmento promotor y una secuencia de DNA para un producto génico seleccionado junto con una secuencia 3’ no traducida apropiada dentro de una célula.

35 El término “operativamente unido” se refiere a la asociación de las secuencias de ácidos nucleicos en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de uno es afectada por la del otro. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar operativamente unidas a las secuencias reguladoras con orientación con sentido o antisentido.

40 El término “marcador seleccionable” significa un factor de identificación, normalmente un antibiótico o un gen de resistencia química, que puede seleccionarse basándose en el efecto del gen marcador, es decir, resistencia a un antibiótico, en donde el efecto se utiliza para rastrear la herencia de un ácido nucleico de interés y/o para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés.

45 El término “heterólogo” significa que no se encuentra naturalmente en la ubicación de interés. Por ejemplo, un gen heterólogo se refiere a un gen que no se encuentra naturalmente en un organismo huésped, pero que se introduce en el organismo huésped por transferencia génica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico heteróloga que está presente en un gen quimérico es una molécula de ácido nucleico que no se encuentra naturalmente asociada con los otros segmentos del gen quimérico, tales como las moléculas de ácido nucleico que tienen una región codificante y segmentos del promotor que no están naturalmente asociados entre sí.

50 Como se usa aquí, una “molécula de ácido nucleico aislada” es un polímero de RNA o DNA que es de cadena sencilla o doble cadena, que contiene opcionalmente bases de nucleótidos sintéticos, no naturales o alterados. Una molécula de ácido nucleico aislada en la forma de un polímero de DNA puede comprender uno o más segmentos de cDNA, DNA genómico o DNA sintético.

Los términos “gen promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis*” y “*ZmPgap*” se refieren a una molécula de ácido nucleico con actividad promotora que tiene una secuencia de nucleótidos que ocurre naturalmente en la secuencia anterior a la región codificante de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa del genoma de *Z. mobilis*. Estos términos se refieren a los promotores de las cepas de *Z. mobilis* tales como las cepas CP4 y ZM4 (SEQ ID NOs:1 y 2 respectivamente) y las variantes en la secuencia y/o longitud que dirigen la expresión a un nivel que no es sustancialmente diferente, tal como el *ZmPgap* de pZB4 (SEQ ID NO:3).

El DNA recombinante estándar y las técnicas de clonación molecular utilizadas aquí son bien conocidas en la técnica y están descritas por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1989 (en adelante “Maniatis”); y por Silhavy, T. J., Bannan, M. L. y Enquist, L. W. *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1984; y por Ausubel, F. M. y colaboradores, *In Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing and Wiley Interscience, 1987.

Descubrimiento de los promotores del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa mejorada

Un promotor natural del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* (*ZmPgap* o *Pgap*) se ha utilizado para la expresión de genes quiméricos en *Zymomonas mobilis* y *Zymobacter palmae*. Cuando se ha utilizado *ZmPgap* para expresar genes para el metabolismo de xilosa, la utilización de la xilosa resultante no ha sido típicamente tan eficaz como se deseaba. Una cepa de *Z. mobilis* recombinante modificada para expresar las cuatro enzimas del metabolismo de xilosa (xilosa isomerasa, xilulocinasa, transcetolasa, y transaldolasa) con capacidad limitada de utilización de xilosa se adaptó además en un medio de xilosa para la utilización de xilosa mejorada (descrito en la solicitud de Patente de propiedad común y en trámite U.S. No. US20080286870).

Los solicitantes han descubierto, como se describe aquí en el ejemplo 3, que la cepa mejorada que utiliza xilosa llamada ZW658 (ATCC # PTA-7858) ha aumentado la expresión de los enzimas de la xilosa isomerasa y xilulocinasa que estaban integrados en el genoma como un operón expresado a partir de *ZmPgap* (operón *PgapxyIAB*). Los solicitantes han descubierto además que hay un único cambio de un nuevo nucleótido en el promotor del operón *PgapxyIAB* que es responsable de que el promotor dirija una expresión incrementada de las regiones codificantes unidas operativamente. El cambio de nucleótido es nuevo con respecto a la secuencia del *Pgap* del operón *PgapxyIAB* en la cepa ZW658 en comparación con la secuencia del *ZmPgap* del operón *PgapxyIAB* en una cepa precursora de ZW658 que no tiene las actividades de la xilosa isomerasa y xilulocinasa incrementada. Así el *Pgap* que tiene este único cambio de nucleótido es un promotor mejorado.

Los solicitantes han descubierto además que la cepa de *Z. mobilis* que fue modificada por separado con los genes que codifican las cuatro enzimas de utilización de xilosa y adaptada por separado para la utilización de xilosa mejorada (cepa 8b, descrita en el Documento de Patente U.S. Pat. No. 7,223,575) también ha aumentado la expresión de los enzimas de xilosa isomerasa y xilulocinasa que estaban integradas en el genoma como un operón *PgapxyIAB*. Los solicitantes han descubierto además que hay un único cambio de un nuevo nucleótido en el *Pgap* del operón *PgapxyIAB* en la cepa 8b que está en una posición diferente que el cambio de nucleótido del *Pgap* del ZW658. Basándose en la expresión aumentada de las enzimas de xilosa isomerasa y xilulocinasa codificadas por el operón *PgapxyIAB*, el mutante *Pgap* del operón *PgapxyIAB* proporciona también un promotor mejorado.

Los cambios de nuevos nucleótidos identificados en el *Pgap* de los operones *PgapxyIAB* de la cepa ZW658 y 8b están en las posiciones -190 y -89, respectivamente, con respecto al codón de iniciación de traducción ATG natural para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en las cepas CP4 y ZM4 de *Z. mobilis*. El cambio de nucleótidos descubierto en la posición -190 es de G a T, y en la posición -89 es de C a T.

El contexto de la secuencia de los cambios de base es el factor importante, ya que el número de posición puede cambiar debido a las variaciones de la secuencia.

La posición -190 está en el contexto de la secuencia:

AACGGTATACTGGAATAAATGGTCTTCGTTATGGTATTGATGTTTTT (SEQ ID NO:47)

donde la G negrita y subrayada es la base cambiada a T por la mutación. Esta posición es -190 en la secuencia de *ZmPgap* de las cepas CP4 y ZM4, pero la posición -189 en pZB4 ya que en la secuencia del promotor en pZB4 hay una delección de T en la posición -21. La posición -190 se refiere al nucleótido G en la posición 116 en SEQ ID NO:1.

La posición -89 está en el contexto de la secuencia:

CGGCATCACGAACAGGTGTTGGCCGCGATCGCCGGTAAGTCGGC (SEQ ID NO:48)

donde la C negrita y subrayada es la base cambiada a T por la mutación. Esta posición es -89 en la secuencia de *ZmPgap* de las cepas CP4 y ZM4, pero la posición -88 en pZB4 ya que en la secuencia del promotor en pZB4 hay una delección de T en la posición -21. La posición -89 se refiere al nucleótido C en la posición 217 en SEQ ID NO:1. Los promotores de la presente invención tienen un cambio de nucleótido en *ZmPgap* en la posición -190, en la

posición -89, o en ambas de estas posiciones. Los cambios son un cambio de G a T en la posición -190 y un cambio de C a T en la posición -89. Los presentes promotores que comprenden estas modificaciones son P_{gaps} mejorados.

Los cambios de otros nucleótidos en las posiciones -190 y -89 pueden proporcionar una actividad mejorada de *ZmPgap*. Además, los cambios de nucleótidos en otras posiciones dentro de *ZmPgap* pueden proporcionar una actividad mejorada de promotores.

La secuencia que ocurre naturalmente de *ZmPgap* no es una secuencia única, sino que puede tener alguna variación en la secuencia que no tiene un efecto sustancial en la función del promotor. Que no tenga un efecto sustancial en la función del promotor significa que la secuencia del promotor dirige un nivel de expresión que es sustancialmente similar al nivel de expresión dirigido por un *ZmPgap* presente en una cepa natural de *Zymomonas mobilis*. La variación en la secuencia puede ocurrir naturalmente entre diferentes aislamientos o cepas de *Zymomonas mobilis*, tales como la diferencia entre las cepas CP4 y ZM4 en la posición -29 con respecto al codón de iniciación de traducción de ATG natural para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (SEQ ID NOs:1 y 2, respectivamente), donde en CP4 hay una A y en ZM4 hay una G.

Además de las variaciones de la secuencia natural, los cambios de nucleótidos que no afectan sustancialmente a la función pueden ocurrir durante los procedimientos de manipulación de rutina incluyendo PCR, clonación, transformación, y crecimiento de la cepa como es conocido por un experto en la técnica. Un ejemplo es el *ZmPgap* de pZB4, que tiene una delección de T en la posición -21.

Cualquiera de los cambios de nucleótidos en la secuencia *ZmPgap*, que ocurren en diferentes cepas naturales o modificadas, que no afectan sustancialmente la función del promotor, pueden estar presentes en la secuencia de un promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* tal como la delección de una T después de la posición -21 que está en la *ZmPgap* de pZB4 (SEQ ID NO:3). Por lo tanto las mutaciones en las posiciones -190 y -89 descritas anteriormente que afectan a la función del promotor, es decir, que mejoran sustancialmente la función del promotor, pueden realizarse en cualquiera de las secuencias de *ZmPgap* con actividad sustancialmente similar (nivel natural) y pueden coexistir con variaciones que no afectan a la función.

Ejemplos de secuencias de *Pgap* mejoradas con las mutaciones descritas en las posiciones -189 y/o -88 incluyen la secuencia del promotor de la cepa ZW658 (SEQ ID NO:4), de la cepa 8b (SEQ ID NO:5), y una doble mutación de la misma variante de *ZmPgap* que es de pZB4 (SEQ ID NO:6). Ejemplos adicionales de secuencias de *Pgap* mejoradas son las mutaciones en -190, -89, o doble mutación en la variante *ZmPgap* de CP4 (SEQ ID NOs:7, 8, y 9, respectivamente) y las mutaciones en -190, -89, o doble mutación en la variante *ZmPgap* de ZM4 (SEQ ID NOs:10, 11, y 12, respectivamente).

Además, se producen variaciones en la longitud de la *ZmPgap* que no afectan sustancialmente la función del promotor. La presente invención incluye *Pgaps* mejorados que tienen las mutaciones descritas en la posición -190 y/o -89 con respecto al codón de iniciación de traducción del ATG natural para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en las cepas CP4 y ZM4 de *Z. mobilis* en *ZmPgaps* de longitud variable que no tienen un cambio sustancial en la actividad antes de la adición de las mutaciones -190 y/o -89.

Preparación de un *Pgap* mejorado

Las mutaciones descritas en las posiciones -190 y/o -89 se pueden introducir en *ZmPgap* de la molécula de ácido nucleico por un método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, un oligonucleótido que tiene la mutación y la secuencia de DNA circundante se puede sintetizar y clonar en un fragmento de DNA del promotor más grande, sustituyendo un segmento sin la mutación. Los cebadores que contienen la mutación y alguna secuencia del promotor adyacente se pueden sintetizar y utilizar en PCR para preparar un fragmento del promotor. Un fragmento de DNA de promotor entero se puede sintetizar como oligonucleótidos múltiples que se unen entre sí. La mutagénesis dirigida al sitio se puede utilizar para introducir la mutación (es). Además, los promotores mutantes se pueden preparar como fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando DNA de la cepa ZW658 o 8b como plantilla.

Pgap mejorado en genes quiméricos y vectores, introducción en las células bacterianas

Un promotor de la presente invención puede estar unido operativamente a una molécula nucleica heteróloga que se va a expresar en una célula bacteriana, formando una molécula de ácido nucleico quimérico, o un gen quimérico de la presente invención. El diseño y la construcción de los genes quiméricos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Un gen quimérico incluye típicamente un promotor, una molécula de ácido nucleico heterólogo para expresarse, y una región de control de terminación 3'. Las regiones de control de terminación pueden derivarse de diversos genes, y se toman a menudo de genes nativos a células huésped objetivo. La molécula de ácido nucleico heterólogo unida operativamente puede ser cualquier molécula de ácido nucleico cuya expresión se desee en células bacterianas, incluyendo, por ejemplo, una región codificante para una proteína o péptido, o un ácido nucleico para la expresión de un RNA funcional. Los RNAs funcionales incluyen, por ejemplo, RNAs antisentido, ribozimas, y RNAs interferentes. Además se puede construir un operón que comprende el promotor descrito aquí y regiones codificantes múltiples expresadas a partir del promotor.

Los promotores descritos aquí se pueden utilizar en genes quiméricos para la expresión en bacterias pertenecientes a *Zymomonas* o *Zymobacter*. Los genes quiméricos pueden utilizarse para la expresión de cualquier proteína implicada en la producción de un producto de *Zymomonas* o *Zymobacter*. Por ejemplo, una o más enzimas implicadas en la síntesis de un aminoácido tal como la alanina o de sorbitol o xilitol se pueden expresar a partir de un gen quimérico que tiene estos promotores. Los genes quiméricos se pueden expresar en una cepa natural de *Zymomonas* o *Zymobacter* que no utiliza xilosa, o en una cepa que utiliza xilosa. También los promotores descritos aquí se pueden utilizar para la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de la xilosa u otra ruta metabólica.

Los genes quiméricos descritos aquí se construyen típicamente en o se transfieren a un vector para manipulaciones adicionales. Los vectores son bien conocidos en la técnica. Ciertos vectores son capaces de replicarse en un amplio intervalo de bacterias huéspedes y pueden transferirse por conjugación. La secuencia completa y anotada de pRK404 y tres vectores relacionados: pRK437, pRK442, y pRK442(H) están disponibles. Estos derivados han demostrado ser herramientas valiosas para manipulación genética en bacterias gram-negativas (Scott y colaboradores. Plasmid 50(1):74-79 (2003)).

Otros vectores bien conocidos se pueden utilizar en diferentes células huéspedes objetivo. Ejemplos de vectores útiles para diferentes huéspedes se describen en la solicitud de Patente de propiedad común y en trámite US20070092957 A1, pp11-13. Particularmente útiles para la expresión en *Zymomonas* son los vectores que pueden replicarse tanto en *E. coli* como *Zymomonas*, tales como pZB188 que está descrito en el Documento de Patente US 5,514,583. Los vectores pueden incluir plásmidos para la replicación autónoma en una célula, y plásmidos para transportar constructos que se integrarán en genomas bacterianos. Los plásmidos para la integración del DNA pueden incluir transposones, regiones de una secuencia homóloga de ácido nucleico al genoma bacteriano objetivo, u otras secuencias que apoyen la integración. Un tipo adicional de vector puede ser un transposoma producido utilizando, por ejemplo, un sistema que está comercialmente disponible en EPICENTRE®. Es bien sabido como elegir un vector apropiado para el huésped objetivo deseado y la función deseada.

Un promotor descrito aquí se puede construir también en un vector sin una molécula de ácido nucleico unida operativamente para expresión, e integrado adyacente a una región codificante endógena para sustituir un promotor endógeno en un genoma bacteriano o añadir un promotor, por ejemplo a una región codificante sin un operón. La sustitución del promotor cromosómico se puede realizar utilizando métodos tales como los descritos por Yuan y colaboradores (Metab. Eng. (2006) 8:79-90), y White y colaboradores (Can. J. Microbiol. (2007) 53:56-62).

Los vectores que comprenden un promotor descrito aquí pueden introducirse en una célula bacteriana por medios bien conocidos, tales como utilizando transformación congelación-descongelación, transformación mediada por calcio, electroporación, o conjugación.

Expresión de moléculas de ácido nucleico heterólogas utilizando *Pgap* mejorado

Los niveles aumentados de expresión de genes quiméricos se pueden obtener utilizando un *Pgap* mejorado descrito aquí. Un gen quimérico construido con un *Pgap* mejorado y una región codificante de xilosa isomerasa que se integró en el genoma se mostró aquí en el Ejemplo 8 para permitir el crecimiento mejorado en medio de xilosa de células modificadas de *Z. mobilis* para expresar genes que codifican proteínas para el metabolismo de la xilosa. El crecimiento mejorado en xilosa se mostró aquí en los Ejemplos 3 y 10 en relación con la expresión de los niveles más altos de actividad de xilosa isomerasa y las actividades de xilulocinasa. Las cepas de *Z. mobilis* que utilizan xilosa adaptadas para un mejor crecimiento en xilosa y que tienen un *Pgap* mejorado que dirige la expresión de la xilosa isomerasa y xilulocinasa han mejorado la utilización de la xilosa. Las actividades de xilosa isomerasa y xilulocinasa fueron aproximadamente 4 a 5 veces mayores que en cepas sin un *Pgap* mejorado que dirija la expresión de xilosa isomerasa y xilulocinasa.

El nivel de expresión aumentado de un gen quimérico que contiene un *Pgap* mejorado de la presente invención y localizado en un plásmido estable también se mostró aquí, en el Ejemplo 9. Un gen quimérico que tiene un *Pgap* unido operativamente a una secuencia heteróloga que codifica ribosa-5-fosfato isomerasa (RPI) produjo una mayor cantidad de proteína RPI en comparación con la cantidad producida a partir del gen quimérico que contiene *ZmPgap*.

Ejemplos

Los ejemplos ilustran las invenciones descritas aquí.

Métodos generales

El DNA recombinante estándar y las técnicas de clonación molecular utilizadas aquí son bien conocidas en la técnica y están descritas por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (en adelante "Maniatis"); y por Silhavy, T. J., Bannan, M. L. y Inoué, L. W. Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); y por Ausubel, F. M. y colaboradores, Current Protocols in Molecular Biology, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, Hoboken, NJ (1987).

El significado de las abreviaciones es el siguiente: “kb” significa kilobase(s), “bp” significa pares de bases, “nt” significa nucleótido(s), “h” significa hora(s), “min” significa minuto(s), “s” significa segundo(s), “d” significa día(s), “L” significa litro(s), “ml” significa mililitro(s), “ μ L” significa microlitro(s), “ μ g” significa microgramo(s), “ng” significa nanogramo(s), “mM” significa milimolar, “ μ M” significa micromolar, “nm” significa nanómetro(s), “ μ mol” significa micromol(es), “pmol” significa picomol(es), “Cm” significa cloranfenicol, “Cm^r” significa resistente al cloranfenicol, “Cm^s” significa sensible al cloranfenicol, “Sp^r” significa resistencia a la espectinomicina, “Sp^s” significa sensible a espectinomicina, “XI” es xilosa isomerasa, “XK” es xilulocinasa, “TAL” es transaldolasa, “TKT” es transcetolasa, “EFT” significa tiempo de fermentación transcurrido, “RM” significa medio rico que contiene 10 g/L de extracto de levadura más 2 g/L de KH_2PO_4 , “MM” significa medio de acoplamiento que contiene 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0,2 g/L de KH_2PO_4 .

Preparación de extractos libres de células de *Zymomonas* para ensayos enzimáticos

Las células se hicieron crecer en 50 ml de RM + 2% de glucosa a 30°C durante una noche a un OD_{600} de 1,0-1,2. Las células se recogieron por centrifugación a 4.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se lavó con 25 ml de tampón de sonicación helado (Tris 10 mM, pH 7,6, MgCl_2 10 mM), seguido por centrifugación a 4.500 rpm durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 2,0-2,5 ml de tampón de sonicación más ditiotreitól 1mM. Una alícuota de 500 μ L se centrifugó durante 1 minuto en una centrifuga eppendorf a 4°C. La mayoría del sobrenadante se descartó, dejando aproximadamente 10-20 μ L atrás para evitar que el sedimento se seque. Las células se congelaron y se almacenaron a aproximadamente a 80°C hasta que se ensayaron. Antes del ensayo, las células se descongelaron y se resuspendieron con 500 μ L de tampón de sonicación más ditiotreitól 1 mM. La mezcla se sonicó 2x durante 45 segundos a un ciclo de trabajo del 62% y un control de salida de 2 utilizando un sonicador 450 de Branson, dejando que las muestras se enfriaran aproximadamente 3-5 minutos entre sonicaciones. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 60 minutos en una microcentrifuga Beckman a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se mantuvo a 4°C. El ensayo Pierce BCA se utilizó para determinar las concentraciones de proteínas.

El ensayo de transcetolasa (TKT) se realizó generalmente primero ya que esta enzima es más lábil que las otras. Un diagrama del ensayo de TKT se muestra en las Figura 1A.

En un ensayo de microplaca, 20 μ L de extracto libre de células se añadieron a cada pocillo en una mezcla de reacción, a 30°C, que incluía las siguientes concentraciones finales de componentes: NaDP 0,37 mM, TrisHCl 50 mM pH 7,5, MgCl_2 8,4 mM, TPP 0,1 mM (cloruro de pirofosfato de tiamina), E4P 0,6 mM (eritrosa-4-fosfato), BHP 4 mM (betahidroxipiruvato), PGI 4 U/ml (fosfoglucosa isomerasa), y G6PD 4 U/ml (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). La A_{340} se leyó en un lector de placas durante 3-5 minutos. La actividad de TKT se calculó como sigue:

1 unidad corresponde a la formación de 1 μ mol de D-fructosa 6-fosfato / min a 30°C.

$$U (\mu\text{mol} / \text{min}) = \text{pendiente} (dA_{340} / \text{min}) * \text{volumen de reacción} (\mu\text{L}) / 6.220 / 0,55 \text{ cm}$$

(Moles de NADP \rightarrow NADPH es 6.220 A_{340} por mol por L en una cubeta de 1 cm) (longitud de la trayectoria de 200 μ L por pocillo en microplaca = 0,55 cm)

$$\text{Actividad específica} (\mu\text{mol} / \text{min-mg}) = \mu\text{mol} / \text{min} / \text{concentración de proteína (mg)}$$

La base del ensayo de transaldolasa (TAL) se muestra en la Figura 1B. En un ensayo de microplato, 20 μ L de extracto libre de células se añadió a cada pocillo en una mezcla de reacción, a 30°C, que incluía las siguientes concentraciones finales de componentes: NADH 0,38 mM, trietanolamina 87 mM, EDTA 17 mM, F6P 33 mM (fructosa-6-fosfato), E4P 1,2 mM (eritrosa-4-fosfato), GDH 2,0 U/ml (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa), y TPI 20 U/ml (triosa fosfato isomerasa). La placa se incubó durante 5 minutos, después la A_{340} se leyó durante 3-5 minutos. La actividad de TAL se calculó como sigue:

1 unidad corresponde a la formación de 1 μ mol de D-gliceraldehído por minuto a 30 ° C

$$U (\mu\text{mol} / \text{min}) = \text{pendiente} (dA_{340} / \text{min}) * \text{volumen de reacción} (\mu\text{L}) / 6.220 / 0,55 \text{ cm}$$

(Moles de NADH \rightarrow NAD es 6.220 A_{340} por mol por L en una cubeta de 1 cm) (longitud de la trayectoria de 200 μ L por pocillo en microplaca = 0,55 cm)

$$\text{Actividad específica} (\mu\text{moles} / \text{min-mg}) = \text{mol} / \text{min} / \text{proteína}$$

La base del ensayo de xilosa isomerasa (XI) se muestra en la Figura 1C. En un ensayo de microplaca, 20 μ L de extracto libre de células se añadió a cada pocillo en una mezcla de reacción, a 30°C, que incluía las siguientes concentraciones finales de componentes; NADH 0,256 mM, xilosa 50 mM, MgSO_4 10 mM, trietanolamina 10 mM, y SDH 1 U/ml (sorbitol deshidrogenasa). La A_{340} se leyó en un lector de placas durante 3-5 minutos. La actividad de XI se calculó como sigue:

1 unidad de XI corresponde a la formación de 1 μ mol de D-xilulosa por minuto a 30°C

ES 2 627 671 T3

$$U (\mu\text{mol} / \text{min}) = \text{pendiente} (dA_{340} / \text{min}) * \text{volumen de reacción} (\mu\text{L}) / 6.220 / 0,55 \text{ cm}$$

(Moles de NADHP \rightarrow NAD es 6.220 A_{340} por mol por L en una cubeta de 1 cm) (longitud de la trayectoria de 200 μL por pocillo en microplaca = 0,55 cm)

$$\text{Actividad específica} (\mu\text{mol} / \text{min-mg}) = \mu\text{mol} / \text{min} / \text{concentración de proteína (mg)}$$

5 La base del ensayo de xilulocinasa (XK) se muestra en la Figura 1D.

En un ensayo de microplaca, 20 μL de extracto libre de células se añadieron a cada pocillo en una mezcla de reacción, a 30°C, que incluía las siguientes concentraciones finales de componentes: NADH 0,2 mM, Tris HCl 50 mM pH 7,5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,0 mM, ATP 2,0M, PEP 0,2 M (fosfoenolpiruvato), D-xilulosa 8,5 mM, PK 5 U/ml (piruvato kinasas), y LDH 5 U/ml (lactato deshidrogenasa). La A_{340} se leyó en un lector de placas durante 3-5 minutos. La actividad de XI se calculó como sigue:

10

1 unidad corresponde a la formación de 1 μmol de D-xilulosa a D-xilulosa-5-fosfato por minuto a 30°C

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = \text{pendiente} (dA_{340}/\text{min}) * \text{volumen de reacción} (\mu\text{L}) / 6.220 / 0,55 \text{ cm}$$

(Moles de NADHP \rightarrow NAD es 6.220 A_{340} por mol por L en un cubeta de 1 cm) (longitud de la trayectoria de 200 μL por pocillo en microplaca = 0,55 cm)

15

$$\text{Actividad específica} (\mu\text{mol}/\text{min-mg}) = \mu\text{mol} / \text{min} / \text{concentración de proteína (mg)}$$

Método de HPLC

El análisis se hizo con un HPLC Agilent serie 1100 y software ChemStation de Agilent para LC 3D. La columna fue Aminex HPX-87H de BioRad (HPLC Organic Analysis Column 125-0140) con un cartucho de cationes-H Micro-Guard de BioRad (125-0129). Las condiciones de operación fueron:

Flujo	0,6 ml/min
Disolvente	H_2SO_4 0,01N
Tiempo de parada	25 min
Volumen de inyección	5 μL
Muestreador automático	Control de Temperatura @ 10°C o 4°C
Temperatura de la columna	55°C
Detector	Índice de refracción (40°C) con curvas de calibración externas estándar

20 Ejemplo 1

Construcción de cepas de *Zymomonas mobilis* que fermentan xilosa

Como se describe en la solicitud de Patente de propiedad común y en trámite U.S. No. US20080286870, las cepas de *Zymomonas mobilis* que fermentan xilosa se construyeron por integración de dos operones, *PgapxylAB* y *Pgaptalkt*, que contienen cuatro genes que utilizan xilosa que codifican xilosa isomerasa, xilulocinasa, transaldolasa y transcetolas, en el genoma de ZW1 (ATCC #31821) vía eventos secuenciales de transposición, seguido de la adaptación en un medio selectivo que contiene xilosa. Anteriormente, se construyó una cepa de *Zymomonas mobilis* que fermenta xilosa llamada 8b, como se describió en la Solicitud de Patente U.S. App. Pub. No. 20030162271, por integración de dos operones *PgapxylAxyIB* y *Penotalkt*, junto con marcadores de antibióticos seleccionables, en el genoma de *Zymomonas mobilis* 5C a través de una combinación de la recombinación homóloga y enfoques del transposón seguido por la adaptación y mutagénesis NTG. En la preparación de nuevas cepas, se utilizó la transposición (EZ de Epicentro::Tn en el sistema de transposición in vitro), en contraoposición a la recombinación homóloga del sitio específico, ya que este enfoque ofrece las ventajas de múltiples opciones de sitios de integración y frecuencia de inserción relativamente alta. Los cuatro genes que codifican las enzimas que utilizan xilosa se dispusieron y clonaron como dos operones separados: *PgapxylAB* y *Pgaptalkt* para la integración. Un marcador de resistencia a los antibióticos, un gen de resistencia al cloranfenicol (Cm^r) flanqueado por dos secuencias de reconocimiento del fago P1 Cre-recombinasa (*loxP*), se unieron a cada operón para la selección de los integrantes. La integración de los dos operones se llevó a cabo en una de dos etapas, de manera secuencial: *Pgaptalkt* seguido por *PgapxylAB*. La selección de resistencia a Cm se utilizó en ambos eventos de integración, ya que se eliminó mediante la expresión de una Cre-recombinasa en un plásmido seguido del curado del plásmido después de cada integración. Este proceso permitió la utilización del mismo marcador de antibiótico para la selección múltiples veces. Más importantemente, permitió separar el marcador del antibiótico introducido para la selección de la integración de los operones. Este proceso eliminó el impacto negativo del gen(es) de resistencia al antibiótico de la cepa de fermentación para uso comercial.

35

40

Construcción de pMODP*gaptalkt*Cm para transposición

Como se describió en la Solicitud de Patente U. S. App. Pub. No. 20030162271 (Ejemplo 9 allí), un fragmento de DNA de 2,2 kb que contiene trascetolasa (*tk*) que codifica una región de *E. coli* se aisló de pUC*alkt* (Solicitud de Patente U.S. App. Pub. No. 20030162271) mediante digestión y clonación de *Bgl*III/*Xba*I en un vector pMOD (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) digerido con *Bam*HI/*Xba*I, que resulta en pMOD*tk*. Un fragmento PCR llamando *Pgaptal* se generó por fusión de la región del promotor del gen *gap* del *Zymomonas mobilis* (*Pgap*; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) a la región codificante de la transaldolasa (*tal*) de *E. coli* como sigue. Un fragmento de *Pgap* se amplificó a partir de pZB4, la construcción del cual se describe en el documento de Patente U. S. Pat. No. 5514583 (Ejemplo 3), utilizando cebadores con SEQ ID NOs:13 y 14. El pZB4 contiene un operón *PgapxylA/xylB* y un operón *Peno-tal/tkt*. Un fragmento de la región codificante *tal* se amplificó a partir de pZB4 utilizando cebadores con SEQ ID NOs:15 y 16. Un fragmento *Pgaptal* se amplificó utilizando los fragmentos *Pgap* y *tal* como plantilla utilizando cebadores con SEQ ID NOs:17 y 18. Este fragmento se dirigió con *Xba*I y se clonó en el plásmido pMOD*tk*, por encima de la región codificante de *tk*. Un fragmento *loxP::Cm* se generó por PCR utilizando los cebadores *Cmlox*(F,*sfi*) y *Cmlox*(R,*sfi*) (SEQ ID NOs: 19 y 20) y pZB186 como la plantilla. El pZB186 es una combinación de un plásmido nativo de *Z. mobilis* y pACYC184, descrito en el Documento de Patente US514583 (Ejemplo 3) y Zhang y colaboradores ((1995) Science 267:240-243). Finalmente, el fragmento de PCR *loxP::Cm* se insertó en el sitio *Sfi*I del plásmido que contiene *Pgaptalkt* para formar el plásmido integrativo pMODP*gaptalkt*Cm. En este plásmido, el fragmento *PgaptalktloxP::Cm* se insertó entre dos extremos de mosaico (sitios de unión de transposasa) en el vector pMOD. La secuencia completa de nucleótidos para el plásmido pMOD*gaptalkt*Cm se da como SEQ ID NO:21.

Transposición y transformación de pMODP*gaptalkt*Cm en ZW1

El plásmido pMOD es un vector basado en pUC, y por lo tanto es un vector no replicativo en *Zymomonas*. El plásmido pMOD-P*gaptalkt*Cm se trató con transposasa en presencia de Mg^{2+} a temperatura ambiente durante una hora y se utilizó para transformar las células ZW1 por electroporación (utilizando un Pulsador Genético de BioRad fijado a 200 ohms, 25 μ F y 16 Kv/cm). Las células electroporadas se incubaron en un medio de acoplamiento (MM), que consiste en 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/L de K_2HPO_4 suplementado con 50 g/L de glucosa y $MgSO_4$ 1 mM durante 6 horas a 30°C. La mezcla de transformación se colocó en placas de agar que contenían 15 g/L de agar Bacto en MM suplementado con 50 g/L de glucosa y 120 μ g/ml de cloranfenicol y se incubaron anaeróticamente a 30°C. Los transformantes se hicieron visibles después de aproximadamente 2 días. La frecuencia de transformación/transposición fue aproximadamente 3×10^{11} / μ g de DNA.

Se obtuvieron un total de 39 colonias transformantes Cm^r . Veintiuna colonias se recogieron y se analizaron después por PCR y ensayos de actividad enzimática. El PCR que utiliza cebadores SEQ ID NOs:22 y 23 confirmó la presencia de un fragmento de DNA de 3 kb que contiene regiones codificantes *tal* y *tkt* en los transformantes. La transformación de nuevo con DNA del plásmido a partir de las 21 colonias integrantes no generaron ningún transformante de nuevo en *E. coli* lo que sugiere que el *tal* y *tkt* se integraron en el genoma ZW1. Estos integrantes se probaron para las actividades de transaldolasa y transcetolasa utilizando procedimientos modificados para microplacas (Métodos Generales). El ensayo de proteínas Pierce BCA se utilizó para la determinación de las concentraciones de proteínas. Los transformantes se hicieron crecer en un medio RM que contiene 2% (peso/volumen) de glucosa suplementado con 120 μ g/ml de cloranfenicol en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml a 30°C. Las cepas de control 8b y ZW1 se hicieron crecer también (RM más 2% de glucosa se utilizó para ZW1) para ensayos enzimáticos. Las células se recogieron cuando la OD_{600} alcanzó 1,0. Las células se lavaron una vez y se resuspendieron en tampón de sonicación (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 y $MgCl_2$ 10 mM). Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo como se describe en la Solicitud de Patente U.S. App. Pub. No. 20030162271. Las unidades se dieron como μ moles/min-mg. Todas las muestras tenían actividades de transaldolasa y transcetolasa excepto para una.

La hibridación de Southern se llevó a cabo en DNA genómico y plásmido de los integrantes seleccionados digeridos con *Pst*I utilizando una sonda *tkt*. DNA de ZW1 no se hibrida con la sonda *tkt*. Una banda de 1,5 kb común fue visible en todas las muestras de DNA genómico integrante, que es el fragmento de DNA esperado entre un sitio *Pst*I en *tkt* y un sitio *Pst*I en *tal*. Una segunda banda de peso molecular elevado visible (6 kb o mayor) era única entre las líneas independientes T2, T3, T4 y T5 indicando un sitio de integración genómica separado en cada línea. Curiosamente, ambos plásmido y DNA genómico de T5 hibridaron con la sonda *tkt* indicando que era probable que *Pgaptalkt* estuviese también integrado en T5 en el plásmido nativo. Estas cuatro cepas (T2, T3, T4 y T5) se seleccionaron para el tratamiento adicional Cre para eliminar el marcador Cm^r .

Tratamiento Cre para eliminar el marcador Cm^r de los integrantes *talkt*

Para eliminar el marcador Cm^r del cromosoma, T2, T3, T4 y T5 se transformaron con pZB188/Spec-Cre. Este plásmido es un derivado del vector de desplazamiento pZB188 de *Zymomonas-E. coli* (Zhang y colaboradores. (1995) Science 267:240-243; Documento de Patente US 5514583) que contiene un casete de expresión para Cre Recombinasa. pZB188/Spec-Cre es idéntico al vector de Expresión Cre que está descrito en el Ejemplo 10 (pZB188/kan-Cre), excepto que tiene un gen de resistencia a la espectinomicina en vez de un gen de resistencia a la kanamicina. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM agar suplementadas con 2% de glucosa y 200

µg/ml de espectinomicina. Las colonias resistentes Sp^r se recogieron en placas de RM agar suplementado con 2% de glucosa y 200 µg/ml de espectinomicina y placas de RM agar suplementadas con 2% de glucosa y 120 µg/ml de Cm. El cien por ciento de las colonias que se recogieron fueron Cm^s indicando la excisión de alta eficacia de Cm^r por Cre. Los transformantes Sp^rCm^s se cultivaron en RM más 2% de glucosa a 37°C durante 2 a 5 transferencias diarias para curar pZB188aadACreF. En cada transferencia, las células se diluyeron y colocaron en placas de agar en RM más 2% de glucosa para recogerlas en placas adicionales del mismo medio con o sin 200 µg/ml de Sp. Las colonias Sp^s se analizaron por PCR para confirmar la pérdida de pZB188aadACreF. Los descendientes plásmido-curado de los integrantes se nombraron T2C, T3C, T4C y T5C. Para examinar si estos integrantes de transposición eran estables, estas 4 cepas se hicieron crecer en RM más 2% de glucosa y después se transfirieron a 10 ml del mismo medio y se hicieron crecer a 37°C en tubos de ensayo duplicados. Las células se transfirieron diariamente durante diez días, o aproximadamente 100 generaciones. Las colonias se diluyeron y se colocaron en placas RMG para el aislamiento de la colonia después de la primera y décima transferencia. Doce colonias de cada transferencia de cada cepa dieron positivo a la presencia de *Pgaptalkt* por PCR de las colonias utilizando los cebadores 5' *Pgap* y 3' *tkl* (SEQ ID NOs: 13 y 23). Las actividades de transaldolasa y transcetolasa se midieron también para los aislados después de la primera y décima transferencia (como se describe en los Métodos Generales). Todos los 4 integrantes tuvieron niveles similares de ambas actividades TAL y TKT después de 100 generaciones en medio no selectivo, lo que sugiere que estos integrantes eran genéticamente estables.

Construcción de pMODP*gapxy*ABCm para transposición

El siguiente paso fue integrar además el operón *Pgapxy*AB *loxP*::Cm en los integrantes ZW1::P*gaptalkt* (T2C, T3C, T4C y T5C). El plásmido integrativo pMODP*gapxy*ABCm se construyó en base al plásmido pMODP*gaptalkt*Cm (descrito anteriormente). El fragmento *Pgaptalkt* de DNA se separó por digestión *Sac*I/*Sfi*I. Un fragmento adaptador que contiene los sitios de restricción *Sac*I, *Not*I, y *Sfi*I se introdujo por ligación. Un fragmento *Not*I de *Pgapxy*AB, que se aisló de pZB4 (Documento de Patente US 5514583), se clonó después en el sitio *Not*I del adaptador. La xilosa isomerasa (XI) está codificada por *xylA* y xilulocinasa (XK) está codificada por *xylB*. La secuencia de nucleótidos completa para el plásmido pMODP*gapxy*ABCm se da como SEQ ID NO:24.

Transposición y transformación de pMODP*gapxy*ABCm en T2C, T3C, T4C y T5C

Utilizando un enfoque similar a la integración de *Pgaptalkt*Cm, T2C, T3C, T4C y T5C se transformaron/transpusieron con pMODP*gapxy*ABCm (descrito anteriormente) tratado con transposasa. Se obtuvieron seis integrantes (T3CCmX1, T3CCmX2, T3CCmX3, T4CCmX1, T5CCmX1, T5CCmX2) en 2 experimentos transformación/transposición siguiendo la selección Cm. Todos se confirmaron por la presencia de *xyl*AB por PCR utilizando dos conjuntos de cebadores: SEQ ID NOs: 25, y 26, y SEQ ID NOs: 15 y 16 excepto para T2CCmX1 y T2CCmX6 de los cuales ningún fragmento de PCR se detectó utilizando los cebadores SEQ ID NOs:25 y 26.

Los integrantes, incluyendo las 2 líneas negativas de PCR, se ensayaron para las actividades de XI, XK, TAL y TKT (Métodos Generales). Los resultados mostrados en las Figuras 2 y 3 indicaron que los seis integrantes *xyl*AB T3CCmX1, T3CCmX2, T3CCmX3, T4CCmX1, T5CCmX1, y T5CCmX2 todos tenían actividades XI, XK, TAL y TKT. Las actividades de XI y XK se adquirieron nuevamente en comparación con los controles parentales negativos (Figura 2). Las actividades de TAL y TKT se mantuvieron como en los controles parentales. Todos los resultados indicaban que las proteínas eran hechas y funcionales. Los niveles de actividad enzimática variaban, con actividades de TI y XK similares a aquellos integrantes de ZW1 transformados/transpuestos con el mismo plásmido. Los niveles de las actividades de XI, XK, TAL y TKT fueron más bajos que los de la cepa 8b.

La integración del operón *xyl*AB se confirmó por la hibridación de Southern. Ambos DNA genómico y plásmido de las 6 líneas se digirieron con *Sph*I y se hibridaron a una sonda *xylB* etiquetada con digoxenina. Una banda común de aproximadamente 3 kb, que se genera desde un sitio *Sph*I en *xylB* y otro sitio *Sph*I en los sitios de clonación adyacentes en el vector pMOD, estaba presente en todas las muestras de DNA genómico, y además, bandas de hibridación de peso molecular más alto en las muestras de DNA genómico indicaban que había cuatro sitios de integración para el operón *Pgapxy*AB en el cromosoma. T3CCmX1 y T3CCmX2 parecen tener el mismo sitio de integración, T3CCmX3 y T4CCmX1 pueden tener el mismo sitio de integración, y T5CCmX1 y T5CCmX2 tiene cada uno un sitio de integración separado. La digestión del mismo DNA con *Pst*I seguido por la hibridación de Southern con la sonda *tkl* demostró que cada integrante tenía el mismo patrón de hibridación que su cepa parental respectivo.

Adaptación de los ZW1::Integrantes *PgaptalktPgapxy*ABCm en medio xilosa

A pesar de la presencia de las 4 actividades enzimáticas para la utilización de xilosa, observaciones previas (Solicitud de Patente U.S. App. Pub. No. 20030162271) indicaron que los integrantes podían no crecer inmediatamente en xilosa. El crecimiento en xilosa puede ocurrir después de una incubación prolongada en medio xilosa (o en tubos de ensayo o en placas), un proceso llamado adaptación.

Las cepas se adaptaron como sigue. Cepas integrantes ZW1::P*gaptalktPgapxy*ABCm se inocularon en tubos de ensayo que contienen RMX (que contiene 10 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de KH₂PO₄, 20 g/L o 2% (peso/volumen) de xilosa así como en placas MMGX o placas MMX (10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de

triptona, 2,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/L de K_2HPO_4 , MgSO_4 1 mM, 1,5% (peso/volumen) de agar, 0,025% (peso/volumen) de glucosa y 4% (peso/volumen) de xilosa o solo 4% (peso/volumen) de xilosa). El bajo nivel de glucosa se utilizó para apoyar el crecimiento inicial para incrementar la probabilidad de mutación durante la adaptación. Uno de al menos cinco intentos de adaptación en xilosa en ambos cultivos y placas fue exitoso. Después de 10 días de incubación anaeróbica a 37°C, 17 y 19 colonias fueron visibles en placas MMGX con células T3CCmX1 y T3CCmX2, respectivamente. Las colonias eran pequeñas y parecían poco saludables (transparentes) en las placas. Doce colonias (cuatro de la placa T3CCmX1: T3CCmX11, T3CCmX12, T3CCmX13 y T3CCmX110; ocho de la placa T3CCmX2: T3CCmX24, T3CCmX25, T3CCmX26, T3CCmX27, T3CCmX28, T3CCmX29, T3CCmX211 y T3CCmX212) se inocularon en RMGCm120 y se transfirieron en 3 ml RMX para la adaptación adicional para obtener líneas que puedan crecer más rápido en xilosa.

La adaptación de los integrantes en tubos de ensayo que contienen 3 ml de RMX se realizó a 30°C. La OD_{600} se monitorizó constantemente en un espectrofotómetro Spectronic 601. Cuando el crecimiento alcanzó la fase semilogarítmica, los cultivos se transfirieron a tubos nuevos de RMX. Este proceso se continuó durante 7 transferencias. Las velocidades de crecimiento y ODs finales (lecturas no lineales) se mejoraron sobre las transferencias.

Después de la sexta transferencia, los cultivos se sembraron en estrías en placas de RMX para aislar colonias individuales. Tres integrantes crecieron más rápido que los otros en las placas sembradas en estrías: T3CCmX13, T3CCmX26 y T3CCmX27, que se nombran como X13, X26 y X27 en las tablas y en la siguiente discusión. Para seleccionar los mejores cultivadores de xilosa, se seleccionaron cuatro colonias grandes (L1-4) y cuatro colonias pequeñas (S1-4) cada uno para TX13, X26 y X27 y se cultivaron en tubos de ensayo de RMX para que el crecimiento, la utilización de azúcar y la producción de etanol se pudiesen monitorizar. Las colonias se dejaron crecer durante una noche a 30°C seguido por inoculación de $\text{OD}_{600}=0,05$ en 3 ml de RMX en tubos de ensayo por duplicado. X27 creció más lentamente en RMG que los otros cultivos y fue inoculado otra vez 6,5 horas más tarde. Después de 69 horas (62,5 horas para X27), se tomaron muestras para el análisis por HPLC (Métodos Generales). La Figura 4 muestra el promedio del rendimiento de etanol (% de rendimiento teórico) y utilización de xilosa (%) para cultivos a 69 horas (62,5 horas para todos los cultivos X27). No hubo diferencias significativas entre las colonias grandes y pequeñas. Aunque el rendimiento de X27 fue mejor en comparación con el X26 en xilosa, mostró un crecimiento más lento en glucosa. Por lo tanto, se eligieron los mejores, colonias grandes de X13 (X13L3) y X26 (X26L1), para una evaluación adicional en fermentaciones controladas por pH. Las fermentaciones se realizaron en RMG (6% de glucosa), RMX (6% de xilosa) y RMGX (8%:4%; glucosa:xilosa) a 37°C para cepas X13L3 y X26L1, así como la cepa de control 8b. La fermentación de glucosa por X13L3 y X26L1 crecida en RMG (6%) y RMGX (8%:4%) procedió con bastante rapidez. La fermentación de xilosa en el RMGX (8%:4%) fue más lenta tanto para X13L3 como X26L1 en comparación con la de la cepa 8b. Además, el crecimiento en RMX (6%) a 37°C se produjo después de un largo retraso tanto para el X13L3 como X26L1. Varios aislados, X13b, X13c y X13FL, se recuperaron de las fermentaciones en RMX (6%). Estos aislados junto con las cepas originales X13a (un aislado de X13L3) y X26 se sometieron a un tratamiento Cre, como se describió anteriormente en este ejemplo, para eliminar el marcador Cm^r de las cepas ZW1::PgaptalktPgapxylABCm. Los integrantes resultantes libres de Cm^r , tratados con Cre, se nombraron: X13aC, X13bC, X13cC, X13FLC y X26C.

Ejemplo 2

Adaptación y selección de la cepa ZW658

Como se describió anteriormente, la adaptación de las cepas iniciales ZW1::PgaptalktPgapxylABCm en RMX a 30°C mejoró mucho el crecimiento de las cepas en estas condiciones. Sin embargo, las cepas adaptadas sufrieron un retraso largo durante el crecimiento y fermentación en RMX (6%) a 37°C. Para mejorar aún más los integrantes para la fermentación de xilosa en condiciones de procedimiento preferidas que incluyen una concentración de azúcar y temperatura más altas, se siguió el proceso evolutivo o de adaptación en RMX (5%) a 37°C. Se realizaron transferencias en serie y se seleccionaron los mejores cultivadores. Los integrantes utilizados en este proceso incluyeron X13aC, X13bC, X13cC, X26C y X13FLC. Estas 5 cepas se cultivaron en RMX a 30°C durante 6 transferencias antes de transferirse a RMX (5%) a 37°C durante otras 5 a 16 transferencias. Durante y después todos los cultivos transferidos se sembraron en estrías en placas de RMX y se incubaron a 37°C para aislar las colonias individuales. Las colonias grandes se sembraron además en estrías en placas de RMX y se incubaron a 37°C durante 3 a 4 veces para purificar las colonias. Se seleccionaron las colonias grandes finales para ensayos de crecimiento en RMX (5%) a 37°C.

Evaluación de cepas a partir de la adaptación en medio RMX (5%) a 37°C

Dieciocho colonias aisladas después de la adaptación con transferencias en serie se ensayaron en tubos de ensayo en RMX (5%) a 37°C inicialmente. Se seleccionaron doce cepas para una segunda evaluación en tubos de ensayo. La cepa 8b se incluyó se incluyó en todas las evoluciones para comparación. Las 18 colonias se hicieron crecer en RMG a 37°C durante la noche, se centrifugaron y las células se inocularon en 4 ml de RMX (5%) a 37°C, de forma estática en tubos de ensayo para la primera evaluación. En base a los resultados del crecimiento (OD_{600} , no lineales) y HPLC en el punto final (baja xilosa residual y alto etanol), se seleccionaron 12 cepas para la segunda evaluación.

Uno de los propósitos de la segunda evaluación fue probar la estabilidad del crecimiento mejorado en xilosa y la capacidad de utilización de xilosa de las cepas. Todas las 12 cepas se sometieron a un estudio de estabilidad para ver si las cepas adaptadas eran estables después de exponerlas a un medio no selectivo en el que se transfirieron en serie a 37°C durante 50 generaciones. Los cultivos antes y después de las transferencias en RMG (5%) se inocularon en tubos de ensayo en RMX (5%) y se hicieron crecer a 37°C para la evaluación. Los ODs no lineales se monitorizaron mediante lectura directa de los tubos de ensayo en un espectrofotómetro Spectronic 601. Los ODs a las 70 horas de crecimiento en RMX (5%) antes y después de 50 generaciones de crecimiento en RMG se representaron en la Figura 5. Los resultados indicaban que la mayoría de las cepas eran estables después de 50 generaciones en RMG a 37°C. Los sobrenadantes del punto final (en fase estacionaria) se analizaron también por HPLC para determinar concentraciones de xilosa y etanol. Las bajas concentraciones de xilosa residual y altas concentraciones de etanol en estos cultivos apoyaron el hecho de que la cepa crecía y fermentaba bien la xilosa.

En base a los resultados de la evaluación anterior de los tubos de ensayo (baja xilosa residual, alta concentración de etanol y OD más alto) y el subsecuente cribado del crecimiento de la placa de microtitulación con altas concentraciones de glucosa y/o xilosa (hasta el 20%) y mezclas de glucosa y xilosa con acetato para seleccionar los mejores cultivadores en altos contenidos de azúcar y en presencia de acetato, tal como la cepa #26, denominada ZW658, que mostró el mejor rendimiento general.

Ejemplo 3

Ensayo de las actividades enzimáticas de la ruta pentosa fosfato

Las actividades de las cuatro enzimas que utilizan de xilosa codificadas por genes integrados (descritos en el Ejemplo 1) se midieron como se describe en los Métodos Generales para tres de las cepas seleccionadas para la adaptación a alto contenido de azúcar y 37°C (del Ejemplo 1) y se compararon las actividades de los mismos enzimas en la cepa adaptada adicional ZW658 (del Ejemplo 2). Los resultados, expresados como $\mu\text{moles producto/mg proteína/minuto}$ se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividades enzimáticas en diferentes cepas de *Z. mobilis* adaptadas que utilizan xilosa

Cepa	Xilosa isomerasa	Xilulocinasa	Transaldolasa	Transcetolasa
X13bC	0,033+/-0,013	1,15+/-0,13	1,66+/-0,5	0,22+/-0,02
ZW658	0,25+/-0,033	4,41+/-0,21	2,67+/-1,0	0,19+/-0,05

Los niveles de actividad para ambos miembros del operón *xyIAB* aumentaron en aproximadamente 4 a 8 veces en la cepa ZW658 adaptada adicionalmente en comparación con los niveles de las cepas precursoras parcialmente adaptadas. Hubo poco o ningún cambio en el nivel de expresión de las enzimas del operón *tal/tkt* entre ZW658 y las cepas precursoras parcialmente adaptadas.

Ejemplo 4

Comparación de las secuencias de las regiones promotoras de los operones *xyIAB* en una cepa parcialmente adaptada y en ZW658

Dado que un claro cambio en los niveles de actividad enzimática de los productos de ambos genes bajo el control del promotor GAP (*Pgap*) que dirige *xyIAB* fue un resultado observado de la adaptación que condujo a ZW658, la región promotora de ese operón a partir de una cepa parcialmente adaptada (del Ejemplo 1; posteriormente dado el número de cepa ZW641) y a partir de ZW658 se amplificó por PCR y se secuenció. Un fragmento de PCR se preparó utilizando un cebador de PCR directo (PC11; SEQ ID NO:27) de la región codificante recG donde se integró el operón *PgapxyIAB* y un cebador inverso de la región de codificación *xylA* (PC12; SEQ ID NO:28). El producto resultante del PCR de 961 bp se secuenció utilizando los cebadores LM121, LM122, y LM123 (SEQ ID NOs:29, 30, y 31). La secuencia promotora de ZW641 se da en SEQ ID NO:3 y la de ZW658 en SEQ ID NO:4. Se encontró que ambas secuencias promotoras difieren en una posición de la secuencia publicada del *Pgap* en la cepa CP4 de *Z. mobilis* (SEQ ID NO:1): una delección de 1 base (de una T) después de la posición -21, contando hacia el extremo 5' y empezando desde el anterior codón de inicio ATG para la región de codificación del GAP. Este cambio de secuencia no contribuye a ninguna diferencia en la expresión entre el *Pgap* de ZW641 y el *Pgap* de ZW658 ya que está presente en ambas cepas. Además de este cambio común hubo también una diferencia de un solo par de bases entre las secuencias *Pgap* de ZW641 y ZW658. La G en la posición -189 con respecto a la región de codificación del ATG de inicio para *XylA* en la secuencia de la cepa ZW641 se reemplazó por una T en la secuencia de ZW658. No se observaron otros cambios entre las dos secuencias y parecía posible que un cambio en el nivel de expresión debido a este único cambio de base en la región promotora del GAP podría ser el responsable de las actividades enzimáticas aumentadas encontradas para ambas proteínas codificadas por genes bajo el control de ese promotor.

Ejemplo 5

Construcción de un vector de expresión de la xilosa isomerasa para *Z. mobilis* que tiene el mismo P_{gap} que dirige el operón xylA/B en ZW641 de *Z. mobilis*

5 Se generó una construcción de plásmido que confiere resistencia a la spectinomomicina y expresión de xilosa isomerasa de *E. coli* en *Z. mobilis* (pZB188/aada-GapXylA; donde Gap representa el promotor) como se describe a continuación utilizando un vector de desplazamiento (pZB188) de *E. coli*/*Z. mobilis* como material de partida (Figura 6A). Las etapas involucradas en la construcción de pZB188 se describen en el documento de Patente US 5,514,583. Brevemente, este plásmido de 7008 bp es capaz de replicarse en *E. coli* y *Z. mobilis* porque tiene dos orígenes de replicación diferentes, uno para cada especie bacteriana. pZB188 contiene también un fragmento de DNA que confiere resistencia a la tetraciclina (es decir, un casete Tc^r). La primera etapa en la construcción de pZB188/aada-GapXylA, fue la eliminación del casete Tc^r del pZB188 y reemplazarlo con un fragmento de DNA que confiere resistencia a espectinomomicina (es decir, un casete Spec^r). Para eliminar el casete Tc^r del pZB188, el plásmido se cortó con ClaI y BssHII y el fragmento grande del vector resultante se purificó por electroforesis en gel de agarosa como se describe a continuación con más detalle. El casete Spec^r se generó por PCR utilizando el plásmido pHP15578 (Cahoon y colaboradores, (2003) Nature Biotechnology 21: 1082-1087) como plantilla y los cebadores 1 (SEQ ID NO:32) y 2 (SEQ ID NO:33). El plásmido pHP15578 contiene la secuencia de nucleótidos completa para el casete Spec^r y su promotor, que se basa en la secuencia publicada del gen aadA del Tranposón Tn7 (número de acceso GenBank X03043) que codifica la 3' (9)-O-nucleotidiltransferasa.

Cebador 1 (SEQ ID NO:32)

20 CTACTCATTtatcgatGGAGCACAGGATGACGCCT

Cebador 2 (SEQ ID NO:33)

CATCTTACTacgcgtTGGCAGGTCAGCAAGTGCC

25 Las bases subrayadas del Cebador 1 (cebador delantero) se hibridan justo encima del promotor para el casete Spec^r (a los nucleótidos 4-22 del número de acceso GenBank X03043), mientras que las letras minúsculas corresponden al sitio ClaI que se añadió al extremo 5' del cebador. Las bases subrayadas del Cebador 2 (cebador inverso) se hibridan aproximadamente 130 base por debajo del codón de parada para el casete Spec^r (a los nucleótidos 1002-1020 del número de acceso GenBank X03043), mientras que las letras minúsculas corresponden al sitio AflIII que se añadió al extremo 5' del cebador. El casete Spec^r de 1048 bp generado por PCR se digirió doblemente con ClaI y AflIII, y el fragmento de DNA resultante se purificó utilizando el kit de purificación PCR QIAquick (Qiagen, Cat. No. 28104) y el protocolo recomendado por el proveedor. En la siguiente etapa, el plásmido pZB188 (aislado de *E. coli* SSC110 (dcm⁻, dam⁻) para obtener DNA de un plásmido no metilado para cortar con ClaI (que es sensible a la metilación dam) se digirió doblemente con ClaI y BssHII para eliminar el casete Tc^r, y el fragmento grande del vector resultante se purificó por electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento de DNA y el producto de PCR limpiado se unieron después entre sí, y la mezcla de reacción de transformación se introdujo en *E. coli* JM110 utilizando células químicamente competentes que se obtuvieron a partir de Stratagene (Cat. No. 200239). Se observó que BssHII y AflIII generan "extremos cohesivos" compatibles, pero ambos sitios se destruyen cuando se unen entre sí. Los transformantes se depositaron en medio LB que contenía espectinomomicina (100 µg/ml) y se hicieron crecer a 37°C. Se identificó un transformante resistente a espectinomomicina que contenía un plásmido con el inserto de tamaño correcto mediante análisis de digestión de restricción con NotI, y el plásmido que se seleccionó para una manipulación adicional se hace referencia más adelante como pZB188/aadA. Un diagrama circular de esta construcción se muestra en la Figura 6B.

45 En la siguiente etapa, se insertó un casete de expresión de xilosa isomerasa de *E. coli* entre los sitios NcoI y AclI de pZB188/aadA después de cortar el último con ambas enzimas, y purificar un fragmento grande del vector por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de DNA de ~ 2Kbp que sirvió como casete de expresión de xilosa isomerasa de *E. coli* se aisló del plásmido pZB4 cortando la última construcción con NcoI y ClaI, y purificando el fragmento de DNA relevante por electroforesis en gel de agarosa. El plásmido pZB4 se describe con detalle en el documento de Patente US 5514583, y se muestra una representación esquemática del casete de expresión P_{gap}XylA (SEQ ID. NO:34) de xilosa isomerasa de *E. coli* en el diagrama de caja en la Figura 6D.

50 El fragmento que contiene el casete de expresión de xilosa isomerasa de *E. coli* tiene un sitio NcoI y un sitio ClaI en sus extremos 5' y 3' respectivamente. Como se describe con más detalle en el documento de Patente US 5514583, este fragmento contiene el promotor fuerte, constitutivo de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAP) de *Z. mobilis* (nts 316-619), que se une con precisión al marco de lectura abierto completo del marco de lectura abierto xylA de *E. coli* (nts 620-1942) que codifica la xilosa isomerasa. Contiene también la pequeña región tallo-lazo que sigue inmediatamente el codón de parada de xilosa isomerasa (nts 1965-1999). El casete de expresión de xilosa isomerasa de *E. coli* se insertó entre los sitios NcoI y AclI de pZB188/aadA en una reacción de ligación estándar. Se observa que ClaI y AclI generan "extremos cohesivos" compatibles, pero ambos sitios se destruyen cuando se unen entre sí. La mezcla de reacción de ligación se electroporó después en *E. coli* SSC110 (dcm⁻, dam⁻) para obtener DNA de plásmido no metilado para la posterior transformación de *Z. mobilis*, y las células transformadas se

sembraron en medio LB que contenía 100 µg/ml de espectinomicina; el crecimiento fue a 37°C. Los transformantes resistentes a espectinomicina que tenían un plásmido con un inserto de tamaño correcto se identificaron por análisis de digestión de restricción con NotI, NcoI y AclI. El plásmido que se seleccionó para una manipulación posterior y sobreexpresión de xilosa isomerasa de *E. coli* en la cepa ZW641 de *Z. mobilis* se nombrará a continuación como “pZB188/aadA-641GapXylA”; un diagrama circular de esta construcción de plásmido se muestra en la Figura 6C.

Es importante observar que la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:34 no es idéntica a la secuencia de nucleótidos que se describe en SEQ ID NO:34 en las solicitudes de Patente de propiedad común y en trámite U.S. App. Pub. Nos. US20080286870 y US20080187973, incluso aunque corresponda al mismo casete de expresión (*PgapXylA*) de xilosa isomerasa de *E. coli*. La secuencia de DNA descrita en SEQ ID NO:34 en el presente trabajo tiene una delección de 1 bp en el *Pgap* que corresponde al nucleótido 599 de SEQ ID NO:34 en las solicitudes de Patente U.S. App. Pub. Nos. US20080286870 y US20080187973. La secuencia de nucleótidos que se recogió en solicitudes de Patentes anteriores se basa en la secuencia de DNA publicada del *Pgap* para la cepa CP4 de *Z. mobilis* (Conway y colaboradores. J. Bacteriol. 169 (12):5653-5662 (1987)) y el promotor no fue resecuenciado en ese momento. Recientemente, sin embargo, hemos descubierto que el *Pgap* en pZB4 está perdiendo también el mismo nucleótido, y el casete de expresión (*PgapXylA*) de xilosa isomerasa de *E. coli* que se utilizó para las tres solicitudes de Patente se derivó de este plásmido como se indicó anteriormente.

Ejemplo 6

Generación de un vector de expresión de xilosa isomerasa de *E. coli* que tiene el mismo *Pgap* que dirige el operón *xylA/B* en ZW658 y ZW801-4 de *Z. mobilis*

El plásmido pZB188/aadA-801GapXylA es idéntico al pZB188-aadA-641GapXylA (Figura 6C) pero tiene una sola sustitución de bp en el *Pgap* que corresponde a la mutación G->T que está presente en la posición -189 en la *Pgap* que dirige la expresión del operón *XylA/B* de *E. coli* en ZW658. La misma mutación puntual está también presente en las cepas ZW800 y ZW801-4, que se derivaron secuencialmente de ZW658 como se describe a continuación. La construcción y caracterización de ZW800 y ZW801-4 se describe con gran detalle en la solicitud de Patente de propiedad común y en trámite U.S. App. Pub. No. US20080286870. ZW800 es un derivado de ZW658 que tiene una inserción de doble cruzamiento de un casete de resistencia a espectinomicina en la secuencia que codifica la enzima glucosa-fructosa oxidoreductasa (GFOR) que inactiva esta actividad. ZW801-4 es un derivado de ZW800 en el que el casete de resistencia a espectinomicina se eliminó por recombinación del sitio específico dejando un codón de parada en el marco que trunca prematuramente la proteína. Ninguna de estas manipulaciones alteró la secuencia de nucleótidos del promotor *Pgap* mutante que dirige el operón *XylA/B* en ZW658. Por lo tanto, el “promotor 801 GAP” se refiere a la secuencia del promotor que está presente en las siguientes cepas: ZW658, ZW800, y ZW801-4.

Las etapas y los intermedios del plásmido que se utilizaron para generar pZB188/aadA-801GapXylA se describen a continuación en orden cronológico empezando con el plásmido pMOD-enlazador.

Construcción del pMOD-enlazador

El precursor para el plásmido pMOD-enlazador fue el Vector de Construcción de Transposón pMODTM-2-<MCS> (Cat. No. MOD0602) que está comercialmente disponible en EPICENTRE[®]. Como se muestra en la Figura 7A, pMODTM-2-<MCS> tiene un gen de resistencia a ampicilina (*ampR*), un origen de replicación de *E. coli* (*ori*), y un sitio de multiclonación que está situado entre las dos terminaciones del mosaico (ME) que interaccionan con la transposasa Tn5. La primera etapa en la construcción del pMOD-enlazador fue eliminar el sitio de multiclonación original en pMOD2-<MCS> y remplazarlo con un nuevo sitio de multiclonación que tiene sitios de restricción únicos para AsiSi, FseI y SbfI. Esto se realizó cortando el plásmido con EcoRI y HindIII y purificando el fragmento grande del vector (aproximadamente 2,5 Kbp) por electroforesis en gel de agarosa. El nuevo sitio de multiclonación se generó después recociendo los dos oligonucleótidos sintéticos juntos, el Enlazador B (SEQ ID NO:35) y el Enlazador T (SEQ ID NO:36) que estaban ambos fosforilados en su extremo 5’.

Enlazador B (SEQ ID NO:35):

aattCTACCTGCAGGAGTAGGCCGGCCATGAGCGATCGCA

Enlazador T (SEQ ID NO:36)

agctTGCGATCGCTCATGGCCGGCCTACTCCTGCAGGTAG

Estos oligonucleótidos son complementarios entre sí, y cuando se recuecen juntos forman un enlazador de doble cadena que tiene salientes de una sola cadena a ambos extremos (letras minúsculas), que permiten que el fragmento de DNA esté ligado entre los sitios EcoRI y HindIII del fragmento grande del vector pMODTM-2-<MCS> descrito anteriormente. Como se indicó anteriormente este enlazador sintético contiene también tres sitios de restricción únicos (AsiSi, FseI y SbfI) que se pueden utilizar para las subsiguientes etapas de clonación. El sitio SbfI está subrayado con una línea fina, el sitio FseI está subrayado con una línea gruesa y el sitio AsiSi está subrayado con dos líneas finas. El enlazador B y el enlazador T se recoció juntos y el fragmento de DNA resultante se insertó entre los sitios EcoRI y HindIII de pMODTM-2-<MCS> en una reacción de ligación estándar. La mezcla de la

reacción de ligación se utilizó para transformar DH10B de *E. coli* y las células transformadas se sembraron en medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina. El DNA del plásmido se aisló después de una colonia representativa resistente a ampicilina que contenía el nuevo sitio de multiclonación. Un diagrama circular de la construcción del plásmido resultante (denominada a continuación como "pMOD-enlazador") se muestra en la Figura 7B.

5 Construcción de pMOD-enlazador-Spec

Un fragmento de DNA que confiere resistencia a espectinomicina (Spec^r) y que tiene un sitio loxP de tipo nativo a ambos extremos se insertó entre los sitios AsiSI y FseI de la construcción pMOD-enlazador descrita anteriormente. La fuente del casete Spec^r flanqueado con loxP fue el plásmido pLDHSp-9WW (Figura 8), que se describe con gran detalle en la solicitud de Patente U.S. App. No. 11/862566. En la primera etapa, el DNA del plásmido MOD-enlazador se digirió secuencialmente con FseI y AsiSI, y el fragmento grande del vector se purificó utilizando un kit de columna de centrifugación de DNA Clean & Concentrator TM-5 que se adquirió en Zymo Research Corporation (Cat. No. DO4003). Después, el plásmido pLDHSp-9WW se digirió también dos veces con las mismas dos enzimas y el fragmento pequeño de DNA (aproximadamente 1,1 Kbp) que contenía el casete Spec^r flanqueado con loxP se purificó por electroforesis en gel de agarosa. Los dos fragmentos de DNA de interés se unieron entre sí, y la mezcla de reacción de la transformación se introdujo en DH10B de *E. coli* utilizando electroporación. Los transformantes se sembraron en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml) y el crecimiento fue a 37°C. El DNA del plásmido se aisló después de una de las colonias resistentes a ampicilina que contenía un fragmento de DNA con el tamaño correcto y éste se utilizó para las subsiguientes manipulaciones. Un diagrama circular de esta construcción (denominada a continuación como "pMOD-enlazador-Spec") se muestra en la Figura 7C.

Construcción de pMOD-enlazador-Spec-801GapXylA y pMOD-enlazador-Spec-641GapXylA

Un fragmento de DNA que contiene el *Pgap* completo, la región de codificación XylA, y la región de tallo-lazo que está entre los marcos de lectura abiertos XylA y XylB se amplificó por PCR a partir de ZW801-4 utilizando los cebadores 3 y 4 (SEQ ID NOs:37 y 38, respectivamente) y las células resuspendidas como una plantilla. Como ya se ha indicado, el análisis de la secuencia de DNA ha mostrado que ZW801-4 tiene la misma mutación puntual G->T en la posición -189 en el promotor *Pgap* que dirige la expresión del operón integrado XylA/B de *E. coli* como ZW658 y que las *Pgap* en ambas cepas son idénticas.

Cebador 3 (SEQ ID NO:37)

TCACTCATggccggccGTTCGATCAACAACCCGAATCC

30 Cebador 4 (SEQ ID NO:38)

CTACTCATcctgcaggCCGATATACTTATCGATCGTTCC

Las bases subrayadas del cebador 3 (cebador delantero) se hibridan con las 22 primeras bases de *Pgap* (y a los nts 316-337 de SEQ ID NO:34), mientras que las letras minúsculas corresponden a un sitio FseI que se añadió al extremo 5' del cebador. Las bases subrayadas del cebador 4 (cebador inverso) se hibridan solo con las posteriores de la región tallo-lazo que está después del codón de parada XylA (y a los últimos 12 nts de SEQ ID NO:34), mientras que las letras minúsculas corresponden a un sitio SbfI que se añadió al extremo 5' del cebador.

El producto PCR se digirió doblemente con FseI y SbfI, y se purificó utilizando un kit de columna de centrifugación de DNA Clean & Concentrator TM-5 que se adquirió en Zymo Research Corporation (Cat. No. DO4003). Después, el plásmido de pMOD-enlazador-Spec se cortó con las dos mismas enzimas y el fragmento grande del vector resultante se purificó utilizando el mismo procedimiento. Los dos fragmentos de DNA de interés se unieron entre sí, y la mezcla de reacción de transformación se introdujo en DH10B de *E. coli* utilizando electroporación. Las células se sembraron en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml) y el crecimiento fue a 37°C. Los transformantes que contenían un plásmido con un inserto del tamaño correcto se identificaron por PCR utilizando los cebadores 3 y 4 y las colonias resuspendidas como plantilla ("colonia PCR"). El plásmido que se seleccionó para una manipulación posterior se nombra a continuación como pMOD-enlazador-Spec-801GapXylA, y un diagrama circular de esta construcción se muestra en la Figura 9.

Las mismas etapas descritas anteriormente se utilizaron para generar otro plásmido que se denominará a continuación como "pMOD-enlazador-Spec-641GapXylA", excepto que la plantilla que se utilizó para la amplificación por PCR del fragmento de DNA del gen *Pgap-XylA* fue una suspensión celular de ZW641. pMOD-enlazador-Spec-641GapXylA y pMOD-enlazador-Spec-801GapXylA son idénticos excepto por la sustitución G->T en el *Pgap* que distingue ZW658 (y Z801-4) de ZW641.

Construcción de pZB188-aad-a-801GapXylA

Como se describe en el primer párrafo del Ejemplo 6, pZB188-aadA-801GapXylA es un vector de expresión de xilosa isomerasa de *E. coli* para *Z. mobilis* que es idéntico a pZB188-aadA-641GapXylA, pero tiene la misma sustitución G->T que dirige la expresión del operón integrado *Pgap-XylA/B* en ZW658 (y ZW801-4). Para construir

este plásmido, pMOD-enlazador-Spec-801GapXylA (Figura 10A) se digirió dos veces con MluI y Sall y el fragmento más pequeño de DNA (aproximadamente 1.100 bp) se purificó utilizando electroforesis en gel de agarosa y el kit de recuperación de DNA de Zymoclean Gel (catálogo #D4001, Zymo Research). Este fragmento contiene la sustitución G->T del Pgap y parte del XylA ORF y se utilizó para reemplazar el fragmento correspondiente en pZB188-aadA-641GapXylA (Figura 10B), cortando después la última construcción con las mismas dos enzimas y purificando el fragmento grande del vector por electroforesis en gel de agarosa. Los dos fragmentos de interés se unieron después entre sí y la mezcla de reacción de ligación se introdujo en DH10B de *E. coli* utilizando electroporación. Los transformantes se sembraron en medio LB que contenía espectinomicina (100 µg/ml) y el crecimiento fue a 37°C. El DNA del plásmido se aisló de una colonia resistente a espectinomicina y la presencia de la sustitución G->T del promotor Pgap se confirmó mediante el análisis de la secuencia de DNA. El plásmido utilizado para subsiguientes manipulaciones ("pZB188-aadA-801GapXylA") se muestra en la Figura 10C.

Ejemplo 7

Sobreexpresión de xilosa isomerasa de *E. coli* en ZW641

Las medidas de actividad enzimática en la Tabla 1 muestran que las actividades de la xilosa isomerasa y la xilulocinasa aumentaron dramáticamente durante la transición de ZW641 a ZW658. Para probar la hipótesis de que la xilosa isomerasa es la enzima limitante de la velocidad para el crecimiento sobre xilosa en ZW641, la enzima se sobreexpresó en esta cepa utilizando un plásmido multicopia, pZB188/aadA-641GapXylA (Fig. 6C). El control para este experimento fue ZW641 transformado con el plásmido multicopia pZB188/aadA, que carece del casete de expresión Pgap de xilosa isomerasa de *E. coli* (Fig. 6B). La construcción de ambos de estos plásmidos se describe en el Ejemplo 5, y el protocolo de transformación fue esencialmente como se describe en el Ejemplo 5 de la solicitud de Patente de propiedad común y en trámite U.S. App. Pub. No. US20080187973. Brevemente, el DNA del plásmido no metilado (aislado a partir de SSC110 de *E. coli*, que es una cepa dcm⁻ y dam⁻) se introdujo en ZW641 utilizando electroporación, y las células transformadas se sembraron en medio LB que contenía 200 µg/ml de espectinomicina. Después de un periodo de crecimiento de 48 horas a 30°C bajo condiciones anaeróbicas, se seleccionaron aleatoriamente tres transformantes primarios para cada plásmido, y estos se parchearon (transfirieron) a placas de agar que contenían el mismo medio de crecimiento para la caracterización adicional.

La Figura 11 muestra las curvas de crecimiento (OD600 versus tiempo) en medio que contiene xilosa para las tres cepas que albergan el plásmido de expresión 641 Pgap de xilosa isomerasa de *E. coli* (X1, X2 y X3) y las tres cepas que albergan el plásmido de control (C1, C2 y C3). Este experimento se realizó a 30°C en matraces de agitación (5 ml de cultivos en tubos de 15 ml a 150 rpm), y el medio de crecimiento fue mRM3-X10 (10 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de KH₂PO₄, 1 g/L de MgSO₄ y 100 g/L de xilosa) que también contenía espectinomicina (200 µg/ml). Los cultivos se iniciaron con un lazo de células a partir de la placa parcheada descrita en el párrafo anterior y la OD600 inicial en cada caso fue aproximadamente 0,13. Similar a ZW641, las tres cepas con el plásmido de control apenas crecieron en xilosa. En marcado contraste, tanto la velocidad como la extensión del crecimiento (valores de OD600 final) en xilosa se mejoraron dramáticamente cuando ZW641 se transformó con plásmido de expresión 641 Pgap de xilosa isomerasa de *E. coli*, pZB188/aadA-641GapXylA. Dado que las tres cepas que tenían este plásmido se comportaron igual en el experimento que se muestra en la Figura 11, solo la cepa X1 y la cepa C1 se sometieron a una caracterización adicional.

La Figura 12 muestra una comparación directa de ZW641, ZW658 X1 y C1 en el mismo medio de crecimiento que contiene xilosa sin espectinomicina. Las condiciones para este experimento fueron idénticas a las descritas anteriormente pero los 20 ml de cultivos se hicieron crecer en tubos de 50 ml y los OD600s iniciales fueron aproximadamente 4 veces más bajos (0,035). Las curvas de crecimiento mostradas en la Figura 12A se trazaron en una escala lineal (OD600 versus Tiempo), mientras que la Figura 12B muestra los mismos datos experimentales trazados en una escala logarítmica (logOD600 versus Tiempo) para comparar las velocidades de crecimiento exponenciales. Es evidente a partir de este experimento que la velocidad de crecimiento exponencial de X1 es casi tan rápida como la de la cepa ZW658 adaptada a xilosa, y que esta cepa crece mucho mejor sobre xilosa que la cepa parental ZW641 con o sin el plásmido de control. Por lo tanto, la alta expresión de xilosa isomerasa en ZW641 (dirigido por un promotor 641Pgap a partir de un plásmido multicopia) tiene un efecto similar en el crecimiento sobre xilosa como el aumento de la actividad de la xilosa isomerasa tenía sobre ZW658 (mostrado en la Tabla 1). Aunque el rendimiento final de biomasa para X1 es aproximadamente 2 veces menor que el obtenido con ZW658, está claro a partir de estos datos que la enzima limitante de la velocidad para el crecimiento sobre xilosa en ZW641 es la xilosa isomerasa. Los experimentos mostrados en las Figuras 11 y 12 sugieren además otras dos posibilidades interesantes: (1) que el gran aumento en la actividad de xilosa isomerasa que ocurría durante la transición de ZW641 a ZW658 (Tabla 1) fue en gran parte responsable del mejor crecimiento en xilosa que ocurrió durante el proceso de "adaptación en xilosa"; y (2) que el aumento en la actividad de la xilosa isomerasa podía ser el resultado de la sustitución G->T en el promotor Pgap que dirige la expresión del operón Pgap-XylA/B integrado cromosómicamente que está presente en ZW658.

Ejemplo 8

Integración mediada por trasposón de xilosa isomerasa de *E. coli* en ZW641

ZW641 y dos construcciones de plásmidos (pMOD-enlazador-Spec-801GapXylA y pMOD-enlazador-Spec-641GapXylA) se utilizaron para probar la hipótesis de que el promotor P_{gap} con la sustitución G->T que dirige la expresión del operón XylA/B integrado en ZW658 (denominado en lo sucesivo como el "promotor 801 GAP) es más fuerte que el correspondiente promotor en ZW641 (denominado en lo sucesivo como el "promotor 641 GAP). ZW641 se seleccionó para estos experimentos ya que apenas puede crecer en xilosa, y porque la sobreexpresión de xilosa isomerasa en esta cepa da como resultado un crecimiento más rápido en xilosa (Ejemplo 7, Figs. 11 y 12). La idea básica era introducir una copia adicional del gen de xilosa isomerasa de *E. coli* (dirigido por el promotor 641 GAP o el promotor 801 GAP) en el cromosoma de ZW641 y ver que construcción daría como resultado el crecimiento más rápido en xilosa. La integración cromosómica de los dos genes quiméricos se llevó a cabo utilizando la tecnología de transposoma de Epicentre.

Como ya se ha indicado, pMOD-enlazador-Spec-641GapXylA y pMOD-enlazador-Spec-801GapXylA son plásmidos idénticos excepto por la mutación puntual G->T que está presente en el promotor P_{gap} en la última construcción. El elemento transponible utilizado para la inserción aleatoria en el DNA en ambos casos consistió en dos extremos de mosaico (MEs) de 19 bp y el fragmento de DNA completo que está intercalado entre ellos. Como se muestra en la Fig. 9, este elemento, que se denomina como el transposón, contiene un casete de resistencia a espectinomicina (Spec^r) y un casete de expresión posterior de P_{gap} de xilosa isomerasa de *E. coli*. El protocolo que se utilizó para formar los transposones fue esencialmente el mismo que se describe en el manual de instrucciones de Epicentre para el Vector de Construcción del Transposón EZ::TNTMpMODTM-2<MCS> (Cat. No. MOD0602). Los 8 µL de reacción contenían 1,5 µL de DNA del transposón de extremo romo, 5'-fosforilado que estaba libre de iones Mg⁺⁺ (aproximadamente 250 ng/µL), 4 µL de Transposasa de Epicentre EZ::TN y 2,5 µL de glicerol al 80% (v/v). La mezcla de reacción de transposoma de control fue idéntica pero 4 µL de agua estéril se sustituyeron por la transposasa. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se transfirieron después a 4°C durante un periodo de incubación de 2 a 7 días que es necesario para la lenta etapa de isomerización, que da como resultado la formación de un transposoma activo; utilizando este procedimiento los transposomas son estables durante al menos 3 meses a -20°C.

Los transposomas se electroporaron en ZW641 esencialmente utilizando el mismo protocolo de transformación que se describe en el documento de Patente US 5,514,583. Brevemente, los 40 µL de las reacciones de transformación contenían aproximadamente 10¹⁰ células/ml en glicerol al 10% (v/v), 1 µL de inhibidor de restricción TypeOneTM de Epicentre (Cat. No. TYO261H) y 1 µL de la mezcla de reacción de control o de transposoma. Los ajustes para el electroporador fueron 1,6 kv/cm, 200 Ω, y 25 µF, y la anchura de la rendija de la cubeta fue 0,1 cm. Después de la electroporación, las reacciones de transformación se diluyeron con 1,0 ml de medio de MMG (50 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/L de K₂HPO₄, y MgSO₄ 1 mM) y se dejó que las células se recuperaran durante aproximadamente 3 horas a 30 °C. Las células se recogieron después por centrifugación a temperatura ambiente (13.000 x g, 5 min) en tubos estériles de microcentrífuga de 1,5 ml y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 200 µL de medio MMG líquido y una alícuota de 100 µL de cada suspensión celular se sembró en medio MMG que contenía 1,5% de agar y 200 µg/ml de espectinomicina. Después de un periodo de incubación de 72 horas a 30°C bajo condiciones anaeróbicas, 3 colonias continuaron en la placa de control, 13 colonias continuaron en la placa del transposoma 641GapXylA y 18 colonias continuaron en la placa del transposoma 801GapXylA. Seis colonias de ambas placas de transposomas se seleccionaron aleatoriamente para una caracterización adicional, y éstas se parchearon en placas de agar que contenían medio MMX y 200 µg/ml de espectinomicina; las condiciones de crecimiento fueron las descritas anteriormente. El medio MMX es el mismo que el medio MMG, pero contiene 50 g/L de xilosa en vez de glucosa. Después de una segunda ronda de crecimiento en una placa de MMX nuevo más espectinomicina, las seis cepas que crecían mejor en xilosa (tres para cada transposoma) se utilizaron para el experimento descrito a continuación.

La Figura 13A muestra las curvas de crecimiento lineal para las tres cepas ZW641 que se obtuvieron con el transposoma 641Gap-XylA (#6-1, #6-3 y #6-5) y las tres que recibieron el transposoma 801 Gap XylA (#8-2, #8-4 y #8-5) en medio que contiene xilosa. Los mismos datos se trazaron en una escala logarítmica en la Fig. 13B. Este experimento se realizó a 30°C en matraces de agitación (7 ml de cultivos en tubos de 15 ml a 150 rpm), y mRM3-X10 (10 g/L de extracto de levadura, 2 g/L KH₂PO₄, 1 g/L de MgSO₄ y 100 g/L de xilosa) fue el medio de crecimiento. Los cultivos se empezaron con un lazo de células a partir de la placa parcheada descrita anteriormente y los ODS iniciales fueron muy similares (aproximadamente 0,02-0,03). El control para este experimento fue la cepa ZW658 adaptada a xilosa, que tiene una sustitución G->T en el P_{gap} que dirige el operón XylA/B integrado cromosómicamente de *E. coli*.

De manera similar a la cepa parental (ZW641) las tres cepas que tenían una copia adicional integrada cromosómicamente del casete de expresión 641GapXylA crecieron muy pobremente en un medio que contenía xilosa, aunque era evidente que había algunas pequeñas mejoras tanto en la velocidad de crecimiento y en el rendimiento de biomasa (OD₆₀₀), especialmente para la cepa #6-5 (comparar Fig. 12A y Fig. 13A). En contraste, las tres cepas que se obtuvieron con el transposón 801 GapXylA crecieron mucho mejor en xilosa que la cepa parental (Fig. 13A y Fig. 13B). De hecho, dos de los transformantes (#8-4 y #8-5) crecieron casi tan bien en este azúcar como en ZW658 y los transformantes ZW641 que albergaban el plásmido multicopia pZB188/aadAGapXylA, que contenían el casete de expresión 641 GapXylA (comparar Fig. 12 y Fig. 13). Ya que la transposición es un evento aleatorio y las seis cepas tienen el casete de expresión 641 GapXylA o 801 GapXylA insertado en diferentes

localizaciones en el cromosoma, las diferencias en la expresión del gen extraño que se observaron en este experimento utilizando el mismo transposoma es posible que sean debidas a efectos posicionales. Por ejemplo, los efectos posicionales pueden explicar el mejor crecimiento de #6-5 que de #6-1 y #6-3, y el crecimiento más pobre de #8-2 que de #8-4 y #8-5. Sin embargo, a pesar del pequeño tamaño de la población que se analizó, los resultados que se muestran en la Fig. 13 apoyan firmemente la idea de que la mutación G->T que está presente en el promotor Pgap que dirige el operón XylA/B de *E. coli* en ZW658 y ZW801-4 es la responsable de la mayor actividad de la xilosa isomerasa y el mejor crecimiento en xilosa que se observó con estas cepas, comparado con la cepa parental ZW641.

Ejemplo 9

10 El promotor 801 GAP dirige más altos niveles de expresión de la ribosa 5-fosfato isomerasa en *Z. mobilis* que el promotor 641 GAP

Si el promotor 801 GAP es realmente más fuerte que el promotor 641 GAP, su efecto estimulador en la expresión no debería limitarse al gen de la xilosa isomerasa de *E. coli*, y debería también esperarse la expresión mejorada de otras proteínas con este promotor. Para hacer frente a esta importante cuestión, los genes de *Z. mobilis* que codifican la ribosa 5-fosfato isomerasa (RPI) se unieron a ambos promotores, y los genes quiméricos se insertaron en un plásmido multicopia que se replica en *Z. mobilis*. Los plásmidos de expresión Pgap-RPI resultantes (pZB188/aadA-641GapRPI y pZB188/aadA-801GapRPI) se introdujeron en *Z. mobilis* y los niveles de expresión de RPI se analizaron por SDS-PAGE como se describe a continuación.

Construcción de pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL

20 El plásmido pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL fue un importante intermedio en la construcción de los dos plásmidos de expresión Pgap-RPI que se utilizaron en la presente invención. Como se muestra en la Fig. 14, este plásmido contiene un casete de expresión para el gen de la ribosa 5-fosfato isomerasa (RPI) de *Z. mobilis* que se localiza entre los sitios únicos NcoI y XhoI. Una técnica de PCR de superposición descrita a continuación se utilizó para generar el casete de expresión RPI, que es un gen quimérico que contiene la secuencia del promotor de longitud completa 641 GAP (nts 316-619 de SEQ ID NO:34) y el marco de lectura abierto completo del gen RPI de *Z. mobilis*. El RPI ORF corresponde a los nts 1224730-1225203 del genoma de *Z. mobilis* (número de acceso GenBank AE008692), y el codón de iniciación de RPI está directamente unido al extremo 3' del promotor 641 GAP.

30 La plantilla para el promotor 641 GAP fue pZB188/aadA-641GapXylA, y el fragmento de DNA de 320 bp se amplificó a partir de este plásmido utilizando los cebadores 5 y 6 (SEQ ID NOs:39 y 40, respectivamente) en una reacción de PCR. El producto del PCR resultante contiene el promotor 641 GAP y las primeras 15 bp del RPI ORF de *Z. mobilis* que están unidas a su extremo 3' empezando con el codón de iniciación de GTG. Este fragmento también tiene un sitio único NcoI en su extremo 5' (letras minúsculas) que se añadió al extremo 5' del cebador 5 para fines de clonación.

Cebador 5 (SEQ ID NO:39)

35 CATGccatggGAGCTCGTTTCGATCAACAACCCGAATCCTA

Cebador 6 (SEQ ID NO:40)

CACAGCAGAGGTCACGTTTATTCTCCTAACTTATTAAGTAGC

40 En una reacción PCR independiente, los cebadores 7 y 8 (SEQ ID NOs:41 y 42, respectivamente) se utilizaron para generar un fragmento de 473 bp que contiene el ORF completo del gen RPI nativo de *Z. mobilis*. La plantilla que se utilizó para la amplificación fue un DNA genómico que se aisló de la cepa ZW801-4 de *Z. mobilis*. Hay que tener en cuenta que el extremo 5' del cebador 7 tiene 15 bp de una secuencia de superposición que se puede hibridar al extremo 3' del fragmento del promotor 641 GAP de 320 bp, y que se añadió un sitio XhoI (letras minúsculas) al extremo 5' del cebador 8 para fines de clonación.

Cebador 7 (SEQ ID NO:41)

45 GTTAGGAGAATAAACGTGACCTCTGCTGTGCCATCAAA

Cebador 8 (SEQ ID NO:42)

CCGctcgagCTAGATATTGAACTGAGGATTTCGAAA

50 Los dos fragmentos descritos anteriormente se sometieron después a una reacción PCR de superposición utilizando los cebadores 5 y 8 (SEQ ID NOs:39 y 42, respectivamente), y su manipulación dio como resultado la generación del casete de expresión RPI. Este último es un fragmento de 778 bp que contiene el promotor 641 GAP unido directamente al codón de inicio de RPI ORF de *Z. mobilis*. El producto de PCR se cortó después con NcoI y XhoI, y el fragmento resultante se insertó en los sitios NcoI y XhoI de un plásmido que se deriva en última instancia de pZB188/aadA-641GapXylA (Fig. 6C) para rendir el producto final pZB188aadA/Gap/ZymoRPI/EcoliSL (Fig. 14). Es

importante señalar que este plásmido, que es un vector de expresión RPI para *Z. mobilis*, contiene también la región tallo-lazo que está presente en la región intergénica del operón XylA/B de *E. coli*, y que este elemento estabilizante está localizado entre los sitios XhoI y NotI justo encima del codón de parada de RPI. La secuencia de nucleótidos del casete de expresión de RPI que está en el plásmido pZB188aadA/Gap/ZymoRPI/EcoliSL (incluyendo la estructura tallo-lazo de XylA) se describe en SEQ ID NO:43. La secuencia de nucleótidos que se muestra corresponde al fragmento de DNA que se localiza entre los sitios NcoI y NotI, e incluye ambos sitios de restricción.

Construcción de pZB188/aadA-641GapRPI y pZB188/aadA-801GapRPI

pZB188/aadA-641GapRPI y pZB188/aadA-801GapRPI son plásmidos de expresión de Pgap-RPI para *Z. mobilis* que son idénticos, excepto que la última construcción tiene la sustitución G->T que distingue el promotor 801 GAP del promotor 641 GAP. Un fragmento de DNA de 1.240 bp que se originó a partir de pZB188aadA/Gap/ZymoRPI/EcoliSL se utilizó para convertir pZB188/aadA-641GapXylA (Fig. 6C) a pZB188/aadA-641GapRPI (Fig. 15B) y pZB188/aadA-801GapXylA (Fig. 10C) a pZB188/aadA-801GapRPI (Fig. 15C). Este fragmento de DNA se generó cortando pZB188aadA/Gap/ZymoRPI/EcoliSL con AsiSI y NheI, y purificando el fragmento más pequeño por electroforesis en gel de agarosa. Como se muestra en la Fig. 15A, pZB188aadA/Gap/ZymoRPI/EcoliSL tiene sitios de restricción únicos AsiSI y NheI, y los mismos sitios están también presentes en pZB188/aadA-641GapXylA y pZB188/aadA-801GapXylA. Hay que hacer notar que AsiSI escinde los tres plásmidos en el Pgap posterior de la sustitución G->T que distingue el promotor 801 GAP del promotor 641 GAP, y que NheI corta el esqueleto del plásmido aproximadamente 700 bp posteriores a partir de los codones de parada XylA o RPI. El fragmento de DNA de 1.240 bp que se obtuvo a partir de pZB188aadA/Gap/ZymoRPI/EcoliSL contiene, por tanto, un pequeño tramo de DNA que el promotor 641 GAP y el promotor 801 GAP tienen en común, el marco de lectura abierto de RPI completo y la región tallo-lazo XylA estabilizante.

En la siguiente etapa en la construcción de pZB188/aadA-641GapRPI y pZB188/aadA-801GapRPI, el fragmento de DNA de 1.240 bp descrito anteriormente se insertó entre los sitios AsiSI y NheI en pZB188/aadA-641GapXylA y pZB188/aadA-801GapXylA en dos reacciones de ligación separadas, cortando después ambos plásmidos con AsiSI y NheI y purificando los fragmentos más grandes del vector. Ambas mezclas de reacción de ligación se introdujeron en DH10B de *E. coli* utilizando electroporación, y los transformantes se sembraron en medio LB que contenía espectinomicina (100 µg/ml); el crecimiento fue a 37°C. Finalmente, el DNA de los plásmidos pZB188/aadA-641GapRPI (Fig. 15B) y pZB188/aadA-801GapRPI (Fig. 15C) se aisló a partir de las colonias que contenían la construcción correcta (como se confirmó por el análisis de la secuencia de DNA), y ambos plásmidos se introdujeron en SCS110 de *E. coli* (dam-, dcm-) para generar DNA del plásmido no metilado para la transformación de *Z. mobilis*.

Expresión de RPI con el promotor 641 GAP y el promotor 801 GAP

Los dos vectores de expresión Pgap-RPI descritos anteriormente (pZB188/aadA-641GapRPI y pZB188/aadA-801GapRPI) se introdujeron en la cepa ZW1 de tipo nativo de *Z. mobilis* utilizando electroporación y el DNA del plásmido no metilado. Las células transformadas se hicieron crecer anaeróticamente a 30°C en placas con 1,5% de agar que contenían medio MMG (50 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/L de K₂HPO₄, y MgSO₄ 1mM) y 200 µg/ml de espectinomicina. Dos colonias seleccionadas aleatoriamente que contenían el plásmido 641 GAP-RPI (641gapRpi#1 y 641gapRpi#2) y dos que albergaban el plásmido 801 GAP-RPI (801gapRpi#1 y 801gapRpi#2) se parchearon en una placa con 1,5% de agar que contenía el mismo medio de crecimiento, y la placa se incubó durante aproximadamente 24 horas a 30°C bajo condiciones anaeróbicas. Esta placa se utilizó para iniciar los cultivos de siembra para el experimento de expresión de RPI.

Los cultivos de siembra se empezaron con un lazo de células y se hicieron crecer a 30°C (150 rpm) en tubos tapados de 15 ml que contenían 5ml de medio MMG y espectinomicina (200 µg/ml). El control para este experimento (la cepa parental, ZW1) se hizo crecer bajo las mismas condiciones, pero el medio de crecimiento carecía de espectinomicina. Se dejó que los cultivos de siembra alcanzaran la saturación, y se utilizaron después para iniciar cultivos de 20 ml en tubos tapados de 50 ml, utilizando el mismo medio de crecimiento y condiciones descritas anteriormente. Los valores iniciales de OD600 fueron aproximadamente 0,12 en todos los casos. Alicuotas de los cultivos (500 µL) se recogieron durante la fase exponencial (OD600 aproximadamente 1,1) por centrifugación (15.000 x g, 10 min), y el sedimento celular se resuspendió en 250 µL de muestra tampón 1x SDS-PAGE. Todos los reactivos para electroforesis se obtuvieron de Invitrogen. Un mililitro de muestra tampón 1x SDS-PAGE contiene 250 µL de muestra tampón NuPAGE™ LDS 4X (Cat. No. N0007), 100 µL de muestra de agente reductor NuPAGE™ (Cat. No. NP0004), y 650 µL de agua destilada. Las muestras se calentaron durante 10 minutos a 80°C, y los restos de partículas se separaron por centrifugación (15.000 x g, 10 min). Alicuotas de las muestras clarificadas (20 µL) se sometieron después a un protocolo SDS-PAGE, utilizando un gel NuPAGE™ 12% Bis-Tris (Cat. No. NP0341) y un tampón de ejecución NuPAGE™ MES SDS (Cat. No. NP0002) para muestras reducidas según recomienda el vendedor. El gel se ejecutó a temperatura constante a voltaje constante (180V) durante aproximadamente 1 hora y se tiñó con SimplyBlue SafeStain de Invitrogen (Cat. No. LC6060) como lo recomienda el fabricante.

La masa molecular de la proteína RPI de *Z. mobilis* es 16.927,37 Da basado en la secuencia de DNA del marco de lectura abierto. Como se muestra en la Figura 16, varias bandas de proteína ligeramente teñidas migraron en el gel de poliacrilamida en esta región (es decir, entre los estándares de pesos moleculares 17 kDa y 19 kDa) para la cepa parental, ZW1 (Líneas 2 y 7). La inspección visual del gel reveló que la intensidad de una de las bandas teñida

(indicada con una flecha) aumentó al menos 2 veces cuando el plásmido de expresión 641GAP-RPI se introdujo en ZW1 (Líneas 3 y 5), lo que indica que ésta es la proteína RPI. Además, es bastante evidente en la Figura 12 que la intensidad de la banda RPI en *Z. mobilis* aumentó mucho más dramáticamente para las dos cepas que albergaban el plásmido de expresión 801GAP-RPI (Líneas 4 y 6). Estos datos proporcionaron una evidencia convincente de que el promotor 801 GAP es un promotor más fuerte que el promotor 648 GAP, y que este último es una herramienta útil para expresar genes extraños a niveles muy altos.

Ejemplo 10

Actividad enzimática y comparación de secuencias de las regiones promotoras del GAP transgénico de cepas adaptadas independientemente de *Z. mobilis* utilizando xilosa

Dado que la cepa 8b (Ejemplo 1 y Solicitud de Patente US App. Pub. No. 20030162271) se obtuvo utilizando un curso similar de introducción de genes y adaptación de cepas como ZW658, se compararon también las actividades transgénicas de la ruta de pentosa fosfato y la secuencia del operón *PgapxyIAB* en cepas adaptadas parcialmente y más completamente de esta producción de cepas independientes. Las actividades enzimáticas para productos del operón *PgapxyIAB* en una cepa 8XL4 adaptada parcialmente y la cepa 8b adaptada final se midieron utilizando las técnicas descritas en Métodos Generales y los resultados se expresan como $\mu\text{moles producto/mg proteína/minuto}$ como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividades enzimáticas en diferentes cepas adaptadas utilizando xilosa de *Z. mobilis*

Cepa	Xilosa isomerasa	xilulosa quinasa
8XL4	0,027+/-0,004	1,10+/-0,41
8b	0,142+/-0,057	5,76+/-0,43

Como con la adaptación que ocurrió cuando las cepas que preceden a ZW658 recogió mutaciones que permitieron un crecimiento mejorado en xilosa, la cepa 8b tuvo una actividad aumentada para productos de ambos genes en el operón *xylAB* sobre su cepa predecesora 8XL4. Una vez más el aumento en la medida de la actividad enzimática fue aproximadamente 5 veces mayor que la cepa menos adaptada.

La expresión dirigente del *Pgap* del operón *xylAB* se secuenció en las cepas 8b y 8XL4. Un fragmento de PCR se preparó utilizando un cebador de PCR delantero (GAP-F8; SEQ ID NO:44) a partir del extremo 5' del promotor y un cebador inverso a partir de la región codificante *xylA* (*XylAB851R*; SEQ ID NO:5). El producto de PCR resultante se secuenció utilizando los cebadores GAP-F8, *XylAB449R*, y *XylAB851R* (SEQ ID NOs:44, 46 y 45). La secuencia del promotor a partir de ZW8XL4 se dio en SEQ ID NO:3 y de 8b en SEQ ID NO:5. Estas secuencias de promotores tenían también ambas una diferencia con la secuencia publicada de *Pgap* de la cepa CP4 como en el *Pgap* del operón *xylAB* en ZW641 y ZW658. Además de estos cambios comunes hubo también una diferencia de par de bases única entre las secuencias de *Pgap* de ZW641 y ZW658. Mientras el cambio de G a T en la posición -189 en el ATG de inicio no estaba presente en la comparación de 8XL4 y 8b, un cambio de C a T ocurrió en la posición -89 con respecto al ATG de inicio.

Como con la secuencia del promotor del operón *PgapxyIAB* en la cepa ZW658, la secuencia del promotor del operón *PgapxyIAB* en la cepa 8b cambió durante la adaptación a una nueva secuencia que permitió la producción de más proteína a partir de las regiones codificantes bajo su control que la secuencia del mismo promotor de la cepa parcialmente adaptada.

Listado de secuencias

- <110> Viitanen, Paul Caimi, Perry Tao, Luan Zhang, Yuying McCutchen, Carol McCole, Laura
- <120> Promotores de *Zymomonas* de alta expresión
- <130> CL4236
- <160> 46
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 305
- <212> DNA
- <213> *Zymomonas mobilis*
- <400> 1

ES 2 627 671 T3

	gttc gatcaa caaccggaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aat tttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atactggaat	120
	aaatggtctt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaacaag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atataatagc tacttaataa gttaggagaa	300
	taaac	305
	<210> 2	
	<211> 305	
	<212> DNA	
5	<213> Zymomonas mobilis	
	<400> 2	
	gttc gatcaa caaccggaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aat tttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atactggaat	120
	aaatggtctt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaacaag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atatagtagc tacttaataa gttaggagaa	300
	taaac	305
	<210> 3	
	<211> 304	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ZmPgap clonada con mutación	
	<400> 3	
	gttc gatcaa caaccggaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aat tttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atactggaat	120
	aaatggtctt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaacaag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atataatagc tactaataag ttaggagaat	300
15	aaac	304
	<210> 4	
	<211> 304	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> promotor mutado	
	<400> 4	

ES 2 627 671 T3

	gttc gatcaa caaccggaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aat ttttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atacttgaat	120
	aaatggctctt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaacaag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atataatagc tactaataag ttaggagaat	300
	aaac	304
	<210> 5	
	<211> 304	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Promotor mutante	
	<400> 5	
	gttc gatcaa caaccggaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aat ttttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atacttgaat	120
	aaatggctctt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaataag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atataatagc tactaataag ttaggagaat	300
	aaac	304
10	<210> 6	
	<211> 304	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> promotor con doble mutación	
	<400> 6	
	gttc gatcaa caaccggaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aat ttttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atacttgaat	120
	aaatggctctt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaataag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atataatagc tactaataag ttaggagaat	300
	aaac	304
	<210> 7	
20	<211> 305	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Promotor con mutación	
	<400> 7	

ES 2 627 671 T3

	gttcgatcaa caaccggaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aattttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atacttgaat	120
	aaatggtctt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaacaag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atataatagc tacttaataa gtaggagaa	300
	taaac	305
	<210> 8	
	<211> 305	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Promotor con mutación	
	<400> 8	
	gttcgatcaa caaccggaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aattttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atacttgaat	120
	aaatggtctt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaataag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atataatagc tacttaataa gtaggagaa	300
	taaac	305
10	<210> 9	
	<211> 305	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Promotor con mutaciones	
	<400> 9	
	gttcgatcaa caaccggaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aattttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atacttgaat	120
	aaatggtctt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaataag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atataatagc tacttaataa gtaggagaa	300
	taaac	305
	<210> 10	
20	<211> 305	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Promotor con mutación	
25	<400> 10	

ES 2 627 671 T3

	gttc gatcaa caaccgaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aat tttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atacttgaat	120
	aaatggcttt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaacaag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atatagtagc tacttaataa gttaggagaa	300
	taaac	305
	<210> 11	
	<211> 305	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Promotor con mutación	
	<400> 11	
	gttc gatcaa caaccgaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aat tttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atactggaat	120
	aaatggcttt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaataag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atatagtagc tacttaataa gttaggagaa	300
10	taaac	305
	<210> 12	
	<211> 305	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Promotor con mutaciones	
	<400> 12	
	gttc gatcaa caaccgaat cctatcgtaa tgatgttttg cccgatcagc ctcaatcgac	60
	aat tttacgc gtttcgatcg aagcagggac gacaattggc tgggaacggt atacttgaat	120
	aaatggcttt cgttatggta ttgatgtttt tggatgatcg gccccggcga atgatctata	180
	tgctcatttc ggcttgaccg cagtcggcat cacgaataag gtggtggccg cgatcgccgg	240
	taagtcggca cgttaaaaaa tagctatgga atatagtagc tacttaataa gttaggagaa	300
	taaac	305
	<210> 13	
20	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 13	
	cgatcaacaa cccgaatcct atcg	24
	<210> 14	
	<211> 26	
	<212> DNA	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 14
 5 gccgttattt gtcgaacaga taatgg 26
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 15
 tatgggttca gcgcatgag 20
 <210> 16
 15 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 16
 atgggcatga gatccatagc c 21
 <210> 17
 <211> 38
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 17
 ctactcattt cctgcagggtg gtaactcatt gcgcgctc 38
 30 <210> 18
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 18
 catcttactg gcgcgcaaaa aatctgcggc tgacatac 38
 <210> 19
 <211> 56
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 19
 45 actcatttcc atggcgatcg cactatgctg cgcgaatgta gcacctgaag tcagcc 56
 <210> 20
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>

<223> cebador

<400> 20
atctcactcc atggccggcc aactattaat taagaattga ttggctccaa ttcttg 56

5 <210> 21
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de sitio LoxP

10 <400> 21
cgcataactt cgtataatgt atgctatacg aagttatgc 39

<210> 22
<211> 45
<212> DNA
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de sitio loxP

<400> 22
ggccgcataa cttcgtatag catacattat acgaagttat gcgat 45

20 <210> 23
<211> 43
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Oligonucleótido de sitio loxP

<400> 23
taaataactt cgtataatgt atgctatacg aagttatggc cgg 43

<210> 24
<211> 41
30 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de sitio loxP

<400> 24
35 ccataacttc gtatagcata cattatacga agttattaa t 41

<210> 25
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

<400> 25
ataaaaagcgg ccgcagcaca ggatga 26

<210> 26
45 <211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

50 <400> 26

ggcgtaatt aaggcaggtc agcaag 26
 <210> 27
 <211> 15
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 27
 gcgtcagctg acgcg 15
 10 <210> 28
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 28
 cacatcgtgg aagcaata 18
 <210> 29
 <211> 17
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 29
 25 gccgaaatga gcatata 17
 <210> 30
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 30
 gtgccgactt accgg 15
 35 <210> 31
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 31
 tgacggaatg ctaacg 16
 <210> 32
 <211> 35
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 32
 ctactcattt atcgatggag cacaggatga cgcct 35
 50 <210> 33

ES 2 627 671 T3

```

<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> cebador

<400> 33
catctacta cgcgttgca ggtcagcaag tgcc      34

<210> 34
<211> 2013
10 <212> DNA
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Gen quimérico construido

    <400> 34

    ccatggtgaa aacgggggcg aagaagttgt ccatattggc cacgtttaa tcaaaactgg      60
    tgaaactcac ccagggattg gctgagacga aaaacatatt ctcaataaac cctttaggg      120
    aataggccag gttttcaccg taacacgcca catcttgcca atatatgtgt agaaactgcc      180
    ggaaatcgtc gtggtattca ctccagagcg atgaaaacgt ttcagtttgc tcatggaaaa      240
    cggtgtaaca aggggtgaaca ctatcccata tcaccagctc accgtctttc attgccatac      300
    ggaattagcg gccgcgttcg atcaacaacc cgaatcctat cgtaatgatg ttttgcccga      360
15 tcagcctcaa tcgacaattt tacgcgtttc gatcgaagca gggacgacaa ttggctggga      420

```

ES 2 627 671 T3

```

acgggtatact ggaataaatg gtcttcgtta tggattgat gtttttggg catcggcccc 480
ggcgaatgat ctatatgctc atttcggctt gaccgcagtc ggcatcacga acaaggtgtt 540
ggccgcgatc gccggtaagt cggcacgtta aaaaatagct atggaatata atagctacta 600
ataagttagg agaataaaca tgcaagccta ttttgaccag ctcgatcgcg ttcgttatga 660
aggctcaaaa tcctcaaacc cgttagcatt ccgtcactac aatccccgacg aactgggtgtt 720
gggtaagcgt atggaagagc acttgcgttt tgccgcctgc tactggcaca cttctgctg 780
gaacggggcg gatatgtttg gtgtgggggc gtttaatcgt ccgtggcagc agcctggtga 840
ggcaactggcg ttggcgaagc gtaaagcaga tgtcgcattt gagtttttcc acaagttaca 900
tgtgccattt tattgcttcc acgatgtgga tgtttccctt gagggcgcgt cgtaaaaaga 960
gtacatcaat aattttgcbc aaatggttga tgcctcggca ggcaagcaag aagagagcgg 1020
cgtgaagctg ctgtggggaa cggccaactg ctttacaac cctcgcctac gcgcgggtgc 1080
ggcgacgaac ccagatcctg aagtcttcag ctgggcggca acgcaagttg ttacagcgat 1140
ggaagcaacc cataaattgg gcggtgaaaa ctatgtcctg tggggcggtc gtgaaggta 1200
cgaaacgctg ttaaataacc acttgcgctc ggagcgtgaa caactgggcc gctttatgca 1260
gatggtgggt gagcataaac ataaaatcgg tttccagggc acgttgctta tcgaaccgaa 1320
accgcaagaa ccgaccaaac atcaatatga ttacgatgcc gcgacggtct atggcttctt 1380
gaaacagttt ggtctggaaa aagagattaa actgaacatt gaagctaacc acgcgacgct 1440
ggcaggtcac tctttccatc atgaaatagc caccgccatt gcgcttggcc tgttcggttc 1500
tgtcgacgcc aaccgtggcg atgcgcaact gggctgggac accgaccagt tcccgaacag 1560
tgtggaagag aatgcgctgg tgatgtatga aattctcaa gcaggcggtt tcaccaccgg 1620
tggctotgaa ttcgatgcca aagtacgtcg tcaaagtact gataaatatg atctgtttta 1680
cggctcatatc ggcgcgatgg atacgatggc actggcgctg aaaattgcag cgcgcatgat 1740
tgaagatggc gagctggata aacgcacgc gcagcgttat tccggctgga atagcgaatt 1800
gggccagcaa atcctgaaag gccaaatgtc actggcagat ttagccaaat atgctcagga 1860
acatcatttg tctccggtgc atcagagtgg tcgccaggaa caactggaaa atctggtaaa 1920
ccattatctg ttcgacaaat aacggctaac tgtgcagtcc gttggcccgg ttatcggtag 1980
cgataaccggg cattttttta aggaacgatc gat 2013

```

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligo del sitio de multi-clonación

<400> 35

aattctacct gcaggagtag gccggccatg agcgatcgca 40

<210> 36
 <211> 40
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligo del sitio de multi-clonación

<400> 36
 agcttgcgat cgctcatggc cggcctactc ctgcaggtag 40

10 <210> 37
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> cebador

<400> 37
 tcactcatgg ccggccggtc gatcaacaac ccgaatcc 38

<210> 38
 <211> 39
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 38
 25 ctactcatcc tgcaggccga tatacttacc gatcgttc 39

<210> 39
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 39
 catgccatgg gagctcgttc gatcaacaac ccgaatccta 40

35 <210> 40
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

40 <400> 40
 cacagcagag gtcacgttta ttctcctaac ttattaagta gc 42

<210> 41
 <211> 38
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 41
 gttaggagaa taaacgtgac ctctgctgtg ccatcaaa 38

50 <210> 42

ES 2 627 671 T3

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 42
 ccgctcgagc tagatattga actgaggatt cgaaa 35

 <210> 43
 <211> 903
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Gen quimérico construido

 <400> 43
 ccatggcgag ctcgttcgat caacaaccog aatcctatcg taatgatggt ttgcccgatc 60
 agcctcaatc gacaatttta cgcgtttcga tcgaagcagg gacgacaatt ggctgggaac 120
 ggtatactgg aataaatggt cttcgttatg gtattgatgt ttttgggtgca tcggccccgg 180
 cgaatgatct atatgctcat ttcggcttga ccgcagtcgg catcacgaac aaggtggttg 240
 ccgcgatcgc cggtaagtcg gcacgttaaa aaatagctat ggaatataat agctacttaa 300
 taagttagga gaataaacgt gacctctgct gtgccatcaa atacgaaaaa aaagctggtg 360
 attgcttccg atcacgcagc atttgagttg aatcaacct tgattacttg gctgaaagag 420
 cttggtcgat aggtcgaaga ccttggccct catgaaaacc attcagtcga ttatcccgat 480
 tacggttata agctggctgt cgctatcgca gaaaaaccg ctgatttcgg tattgcttta 540
 tgtggctcgg gaatcggat ctcgatcgct gtcaatcgcc atccggctgc ccgttgcgct 600
 15 ttgattacgg ataaccttac cgcccgtttg gcaagagaac ataacaatgc caatgttatc 660
 gctatgggtg cgagattgat cggcattgaa accgctaagg attgtatttc agctttcctt 720
 gcaacgccgt ttggagggtga acgtcatggt cgccgtatcg ataaactttc gaatcctcag 780
 ttcaatatct agctcgaggc ggccctgaacg tactgcaagt cctgacgtca ctgtgcagtc 840
 cgttggcccg gttatcggta gcgataccgg gcattttttt aaggaacgat cgatagcggc 900
 cgc 903

 <210> 44
 <211> 22
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 44
 atcaacaacc cgaatcctat cg 22

 25 <210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

ES 2 627 671 T3

<220>

<223> cebador

<400> 45

tatgctcaac caccatctgc 20

5

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> cebador

<400> 46

cgacatctgc ttacgcttc 20

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que consiste en un promotor del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* que comprende la sustitución de una base en una posición seleccionada del grupo que consiste en una T reemplazando G en la posición 116, una T reemplazando C en la posición 217, o tanto una T reemplazando G en la posición 116 como una T reemplazando C en la posición 217; en donde los números de posición son con respecto a SEQ ID NO:1 y en donde el promotor resultante es un promotor mejorado que tiene una expresión aumentada.
5
2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.
- 10 3. Un gen quimérico que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 operativamente unida a una molécula de ácido nucleico heteróloga.
4. El gen quimérico de la reivindicación 3 en donde la molécula de ácido nucleico heteróloga codifica una proteína o péptido.
- 15 5. El gen quimérico de la reivindicación 3 en donde la molécula de ácido nucleico heteróloga codifica una molécula de RNA reguladora seleccionada del grupo que consiste en un RNA antisentido, un ribozima, y un RNA de interferencia.
6. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o 2.
- 20 7. Un método para transformar una célula bacteriana seleccionada del grupo que consiste en células *Zymomonas* y células *Zymobacter* que comprende introducir en la célula la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o 2.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 en donde introducir comprende integrar la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 en el genoma de la célula o mantener en un plásmido de replicación estable dentro de la célula.

FIG. 1A

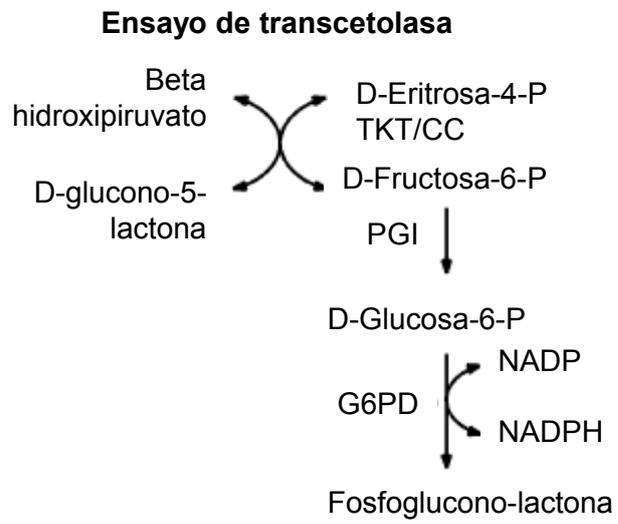


FIG. 1B

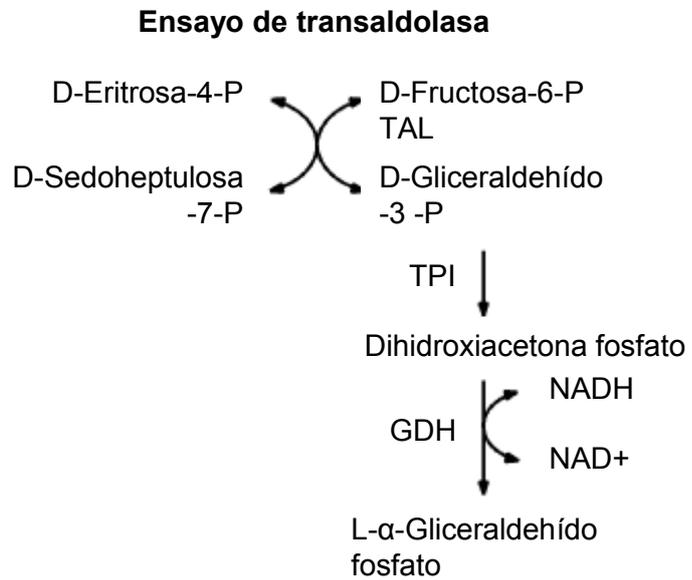


FIG. 1C

Ensayo de xilosa isomerasa

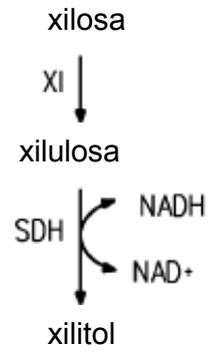
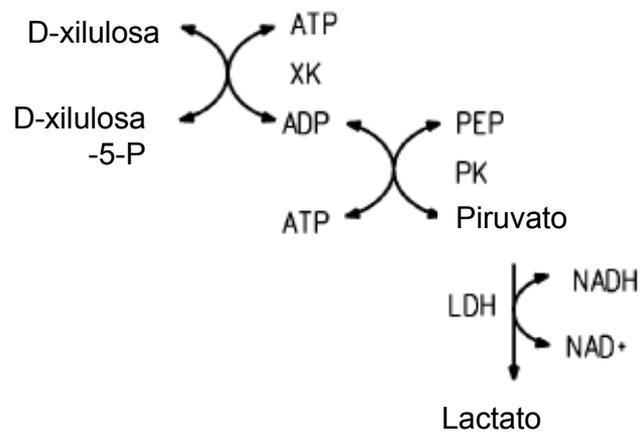


FIG. 1D

Ensayo de xilulocinasa



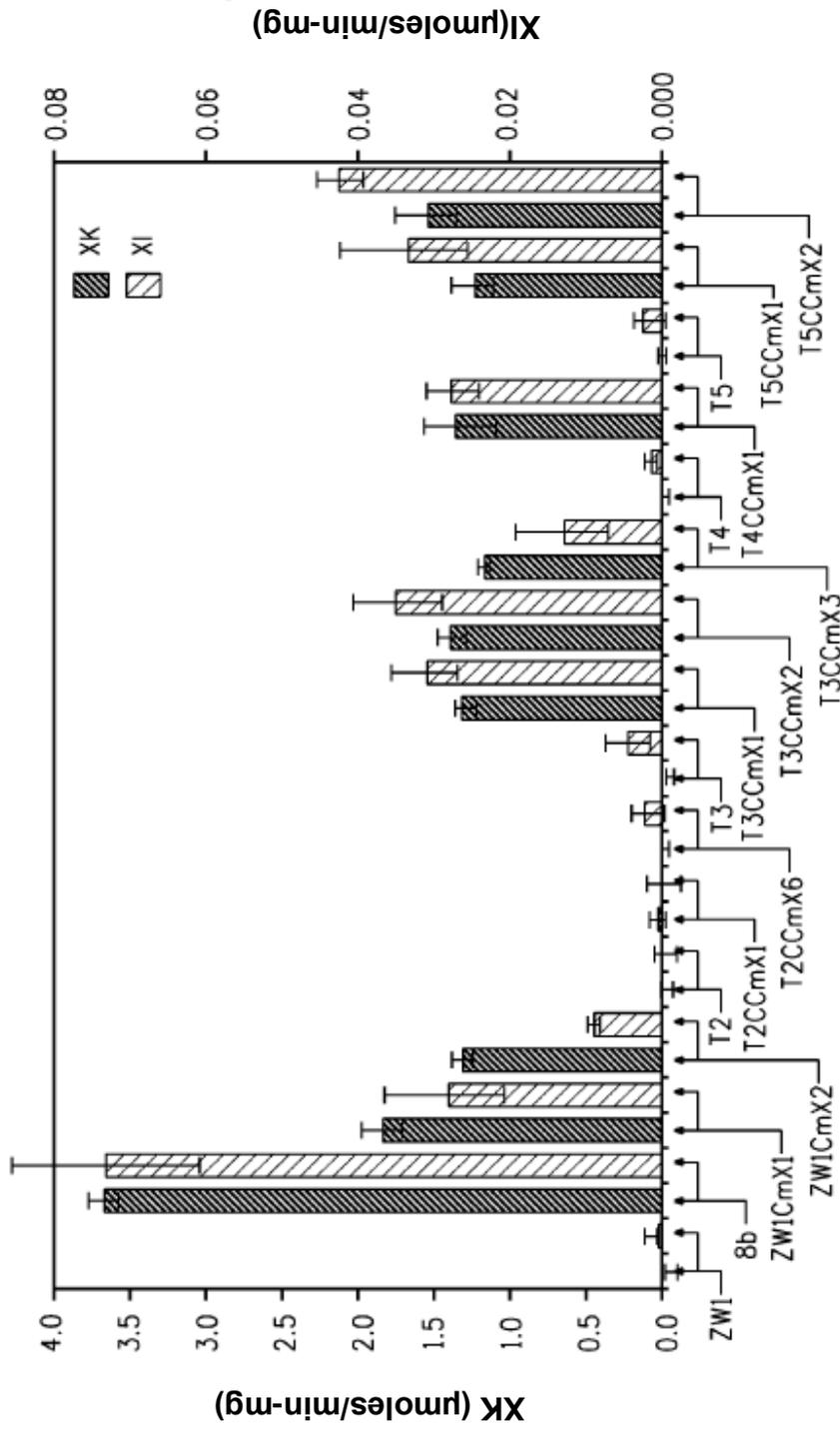


FIG. 2

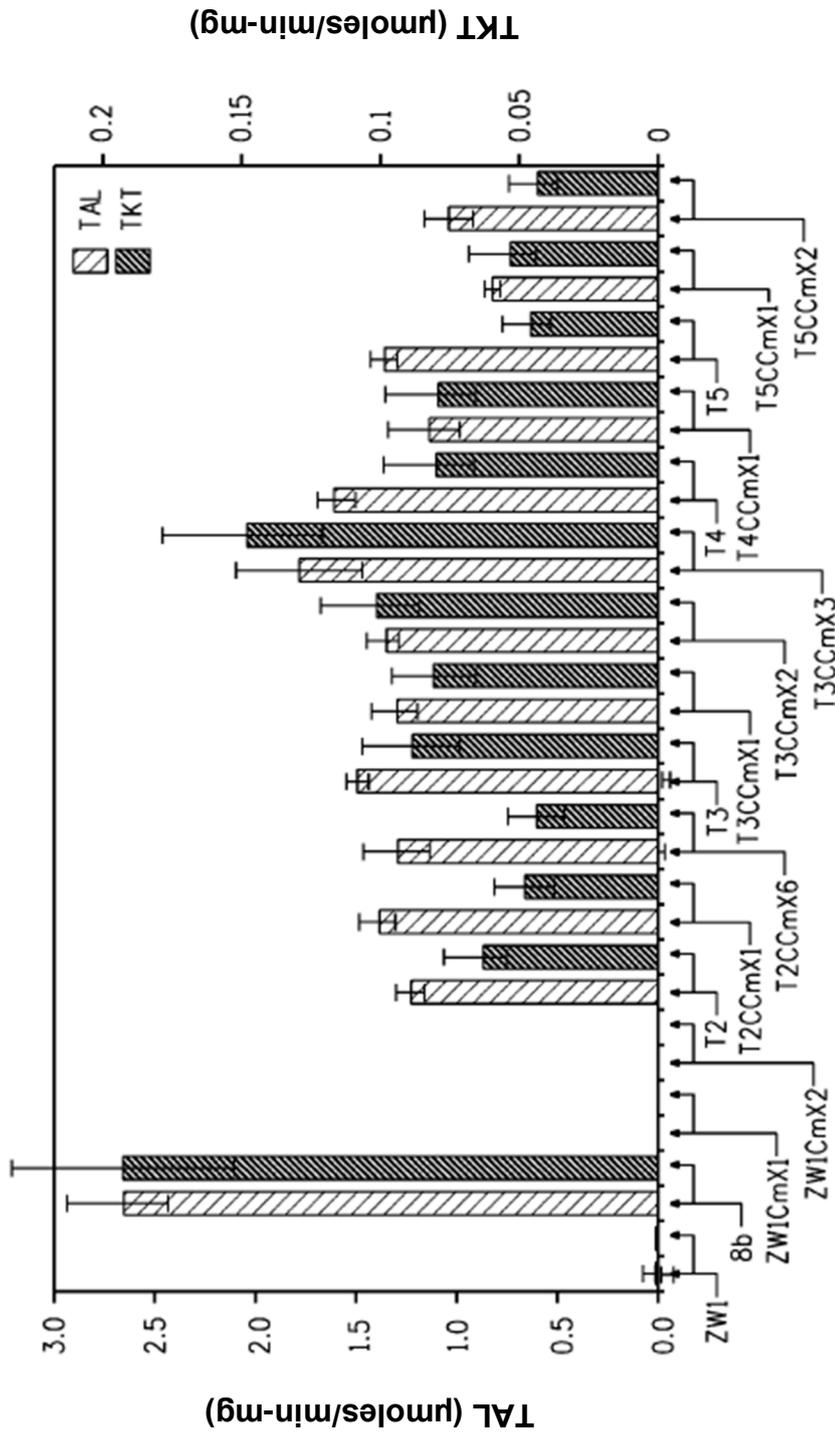


FIG. 3

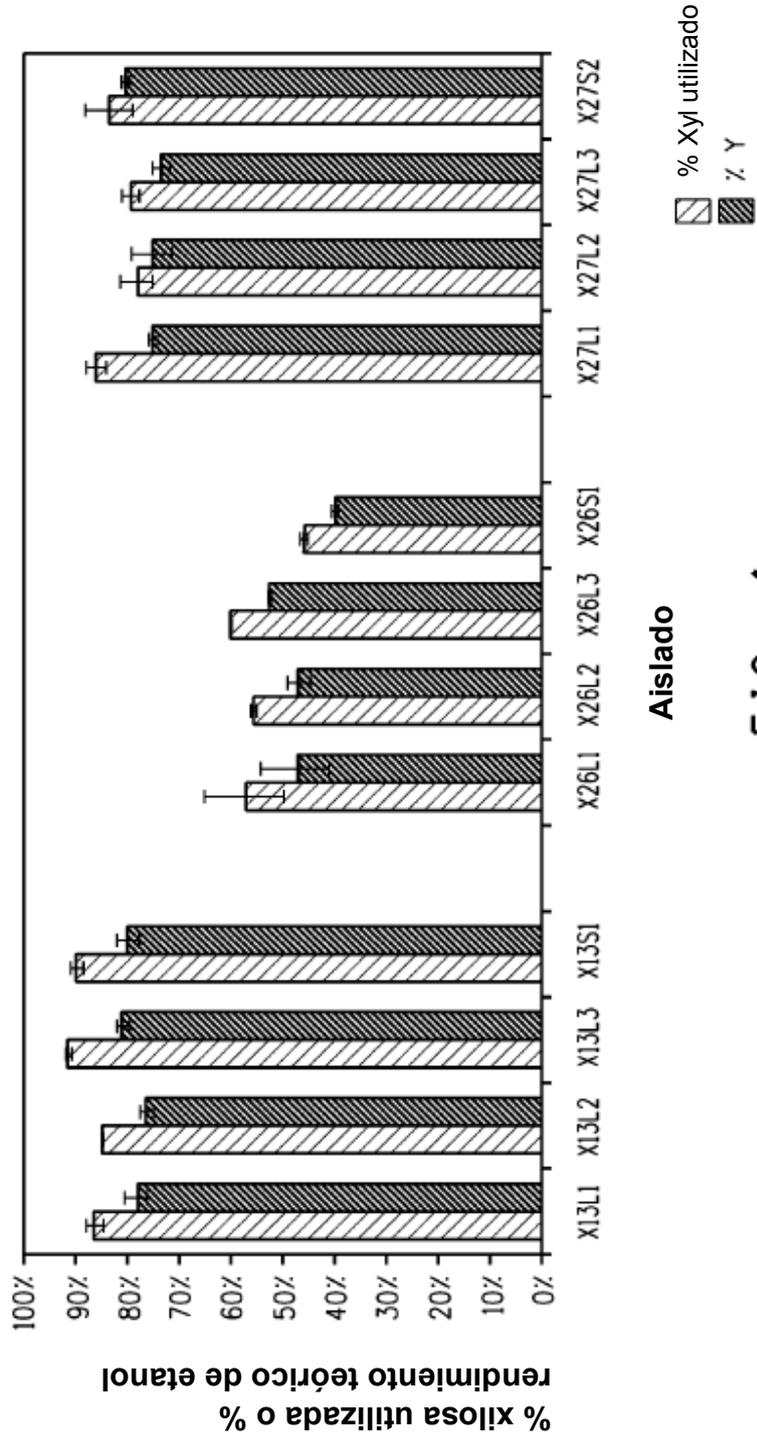


FIG. 4

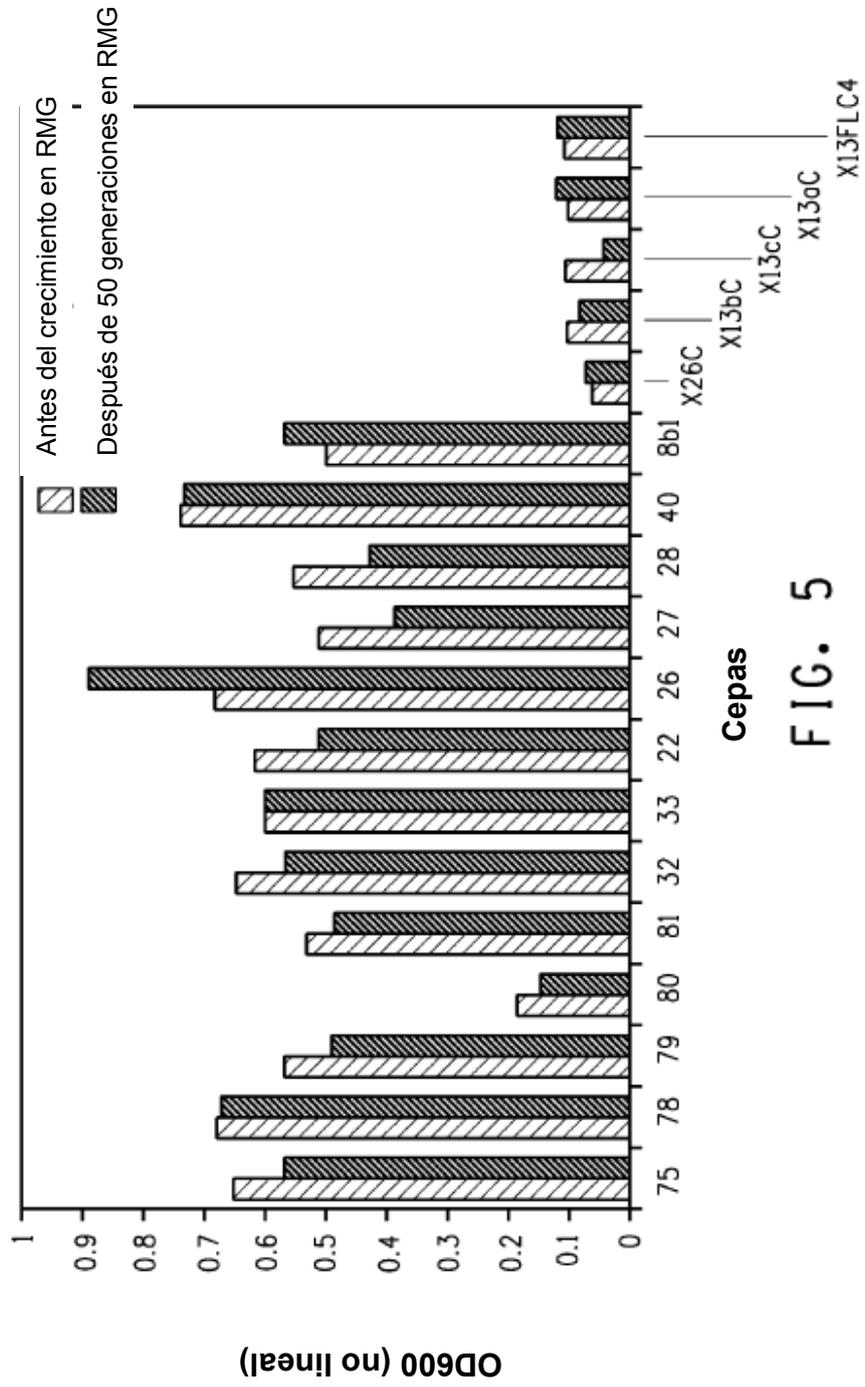


FIG. 5

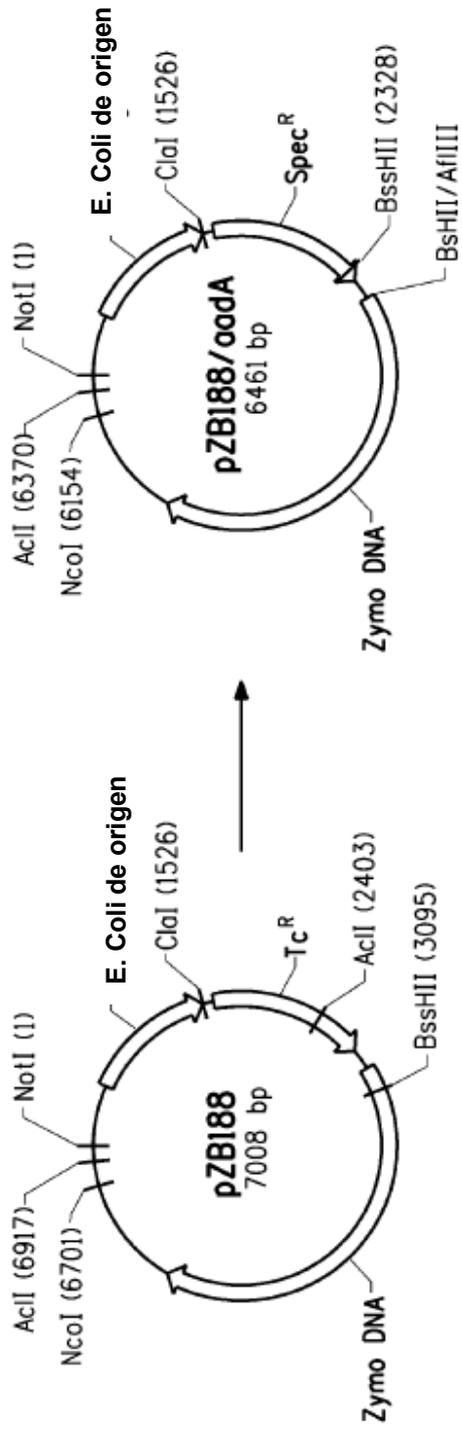


FIG. 6A

Ambos sitios destruidos

FIG. 6B



Continúa en la
Fig. 6C

Continúa desde la
Fig. 6B

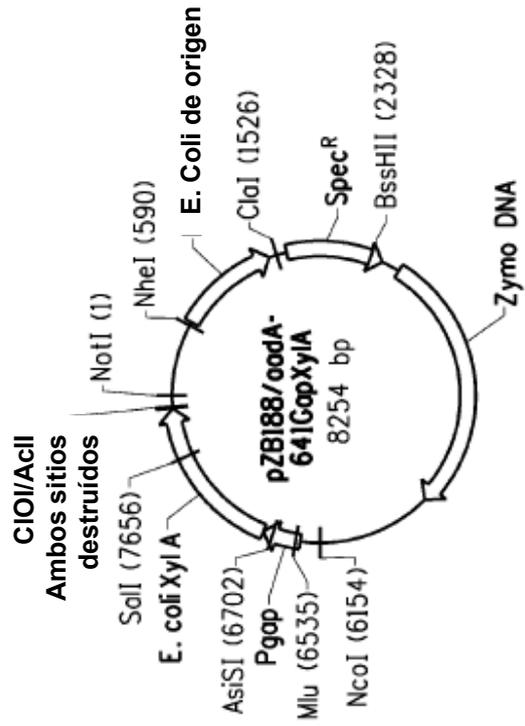


FIG. 6C

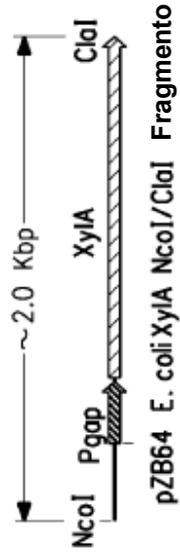


FIG. 6D

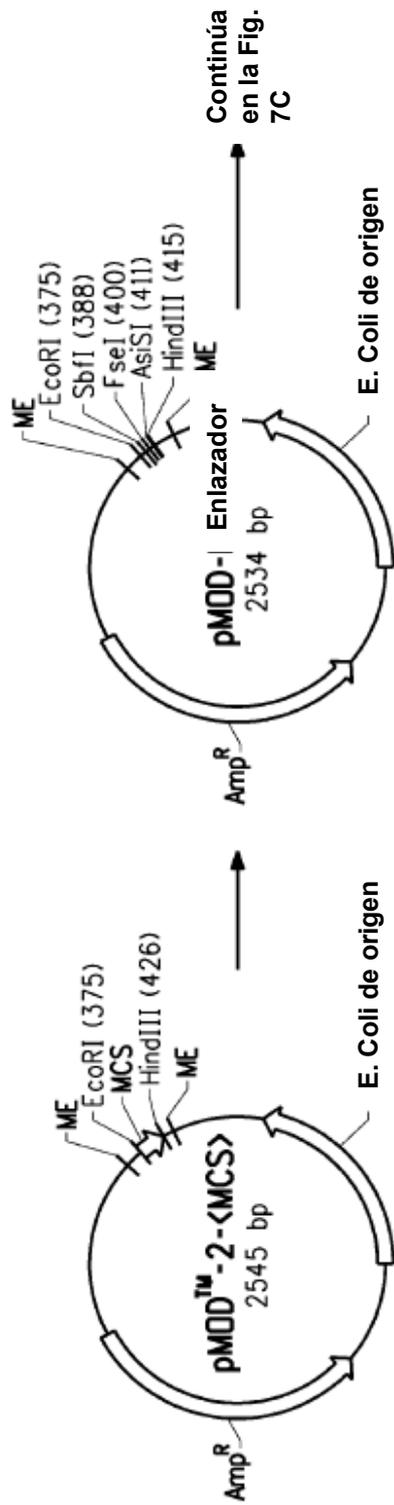


FIG. 7A

FIG. 7B

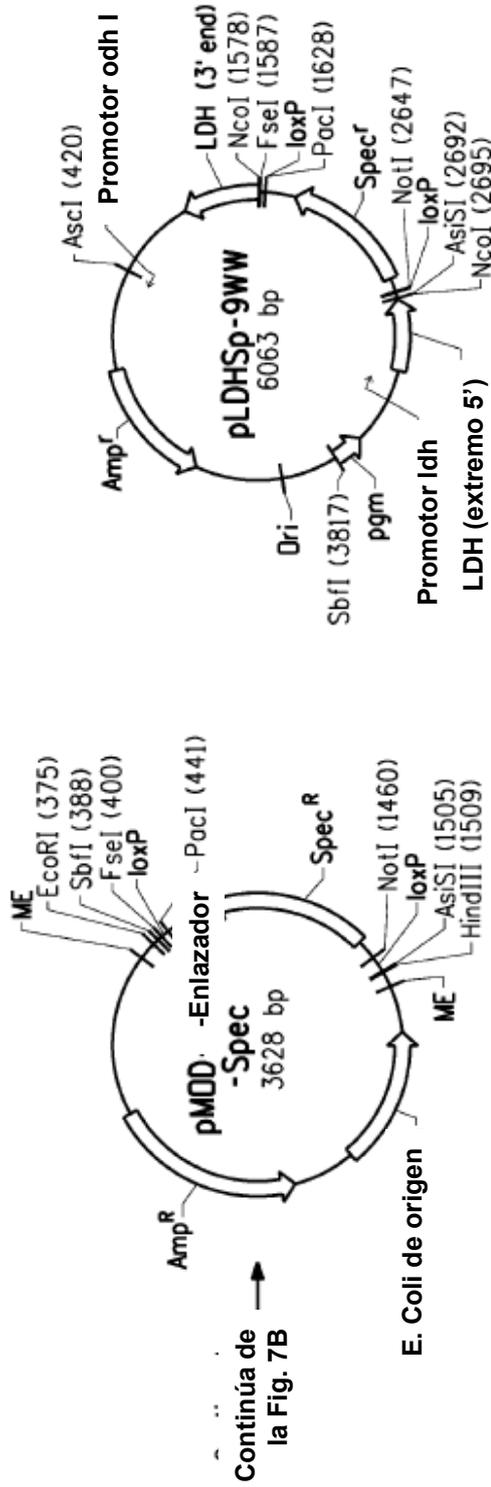


FIG. 8

FIG. 7C

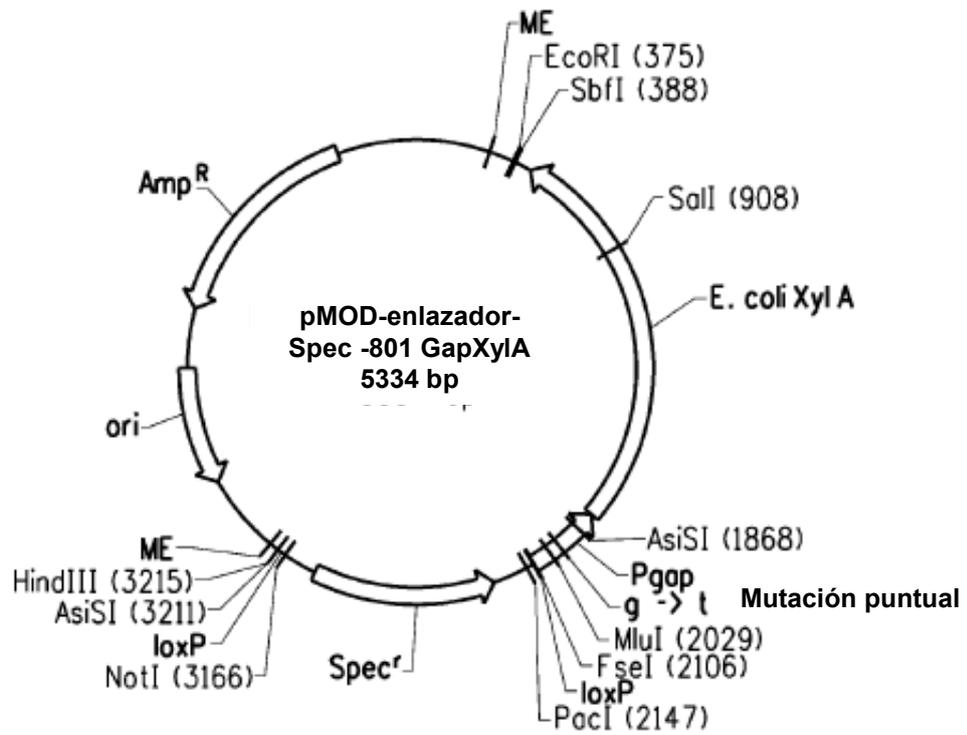


FIG. 9

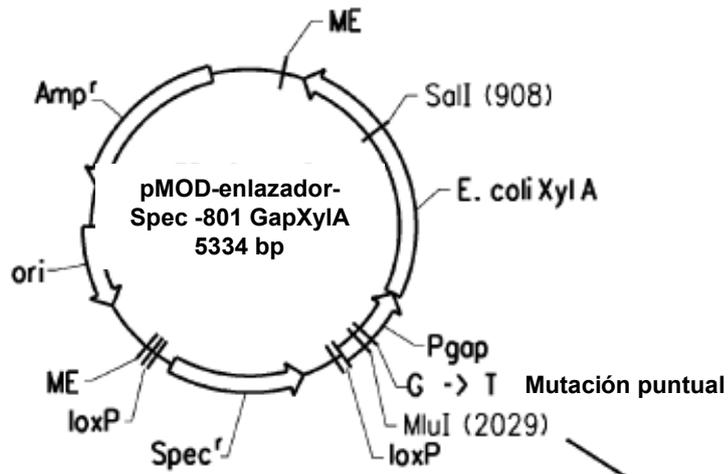


FIG. 10A

Continúa
en la Fig.
10C

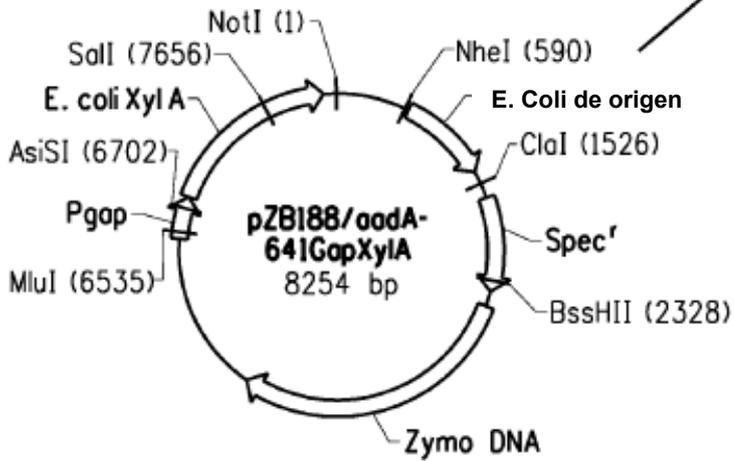


FIG. 10B

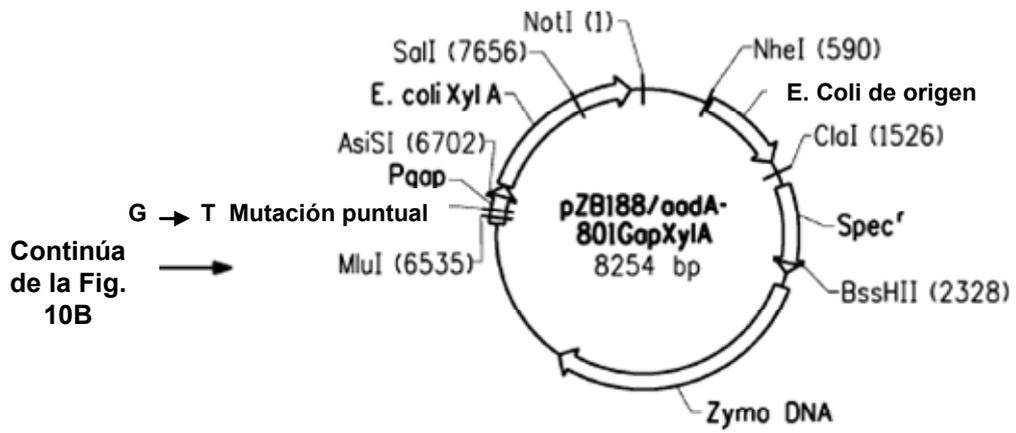


FIG. 10C

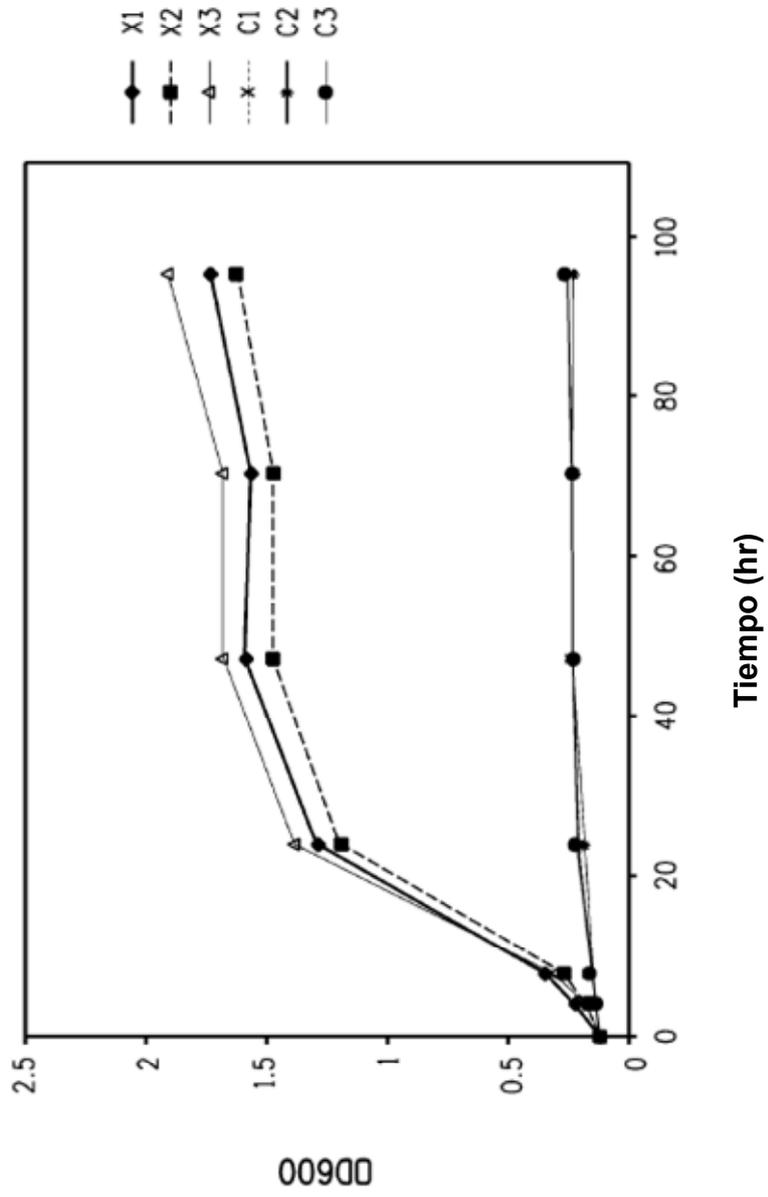


FIG. 11

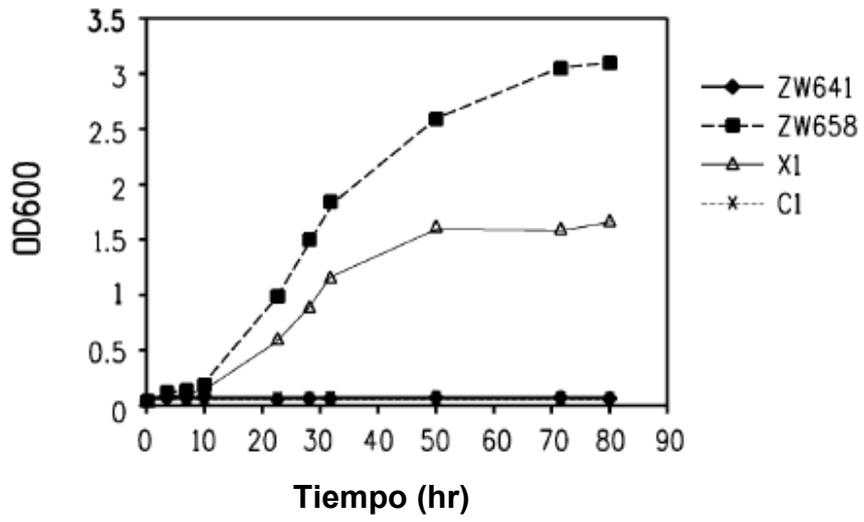


FIG. 12A

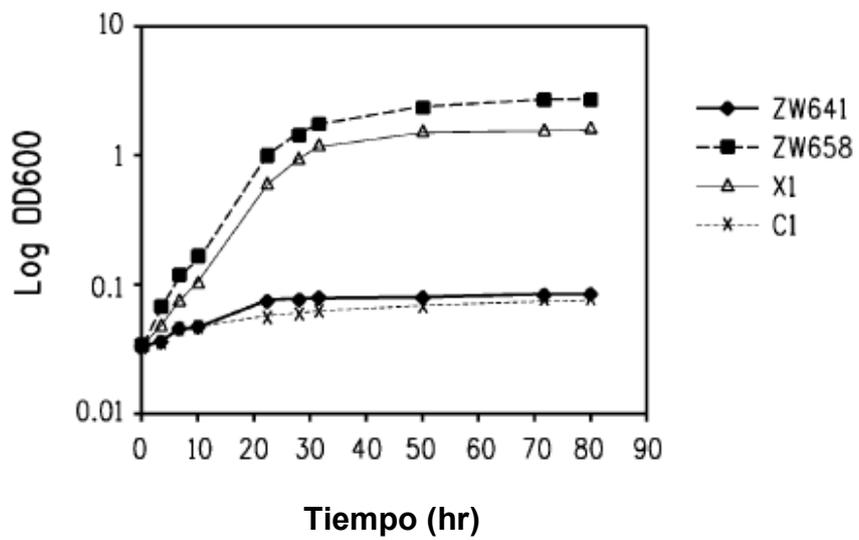


FIG. 12B

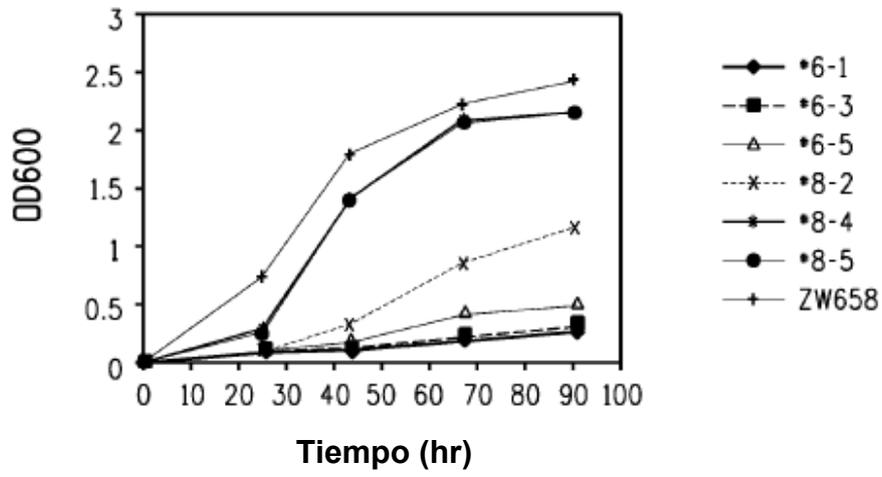


FIG. 13A

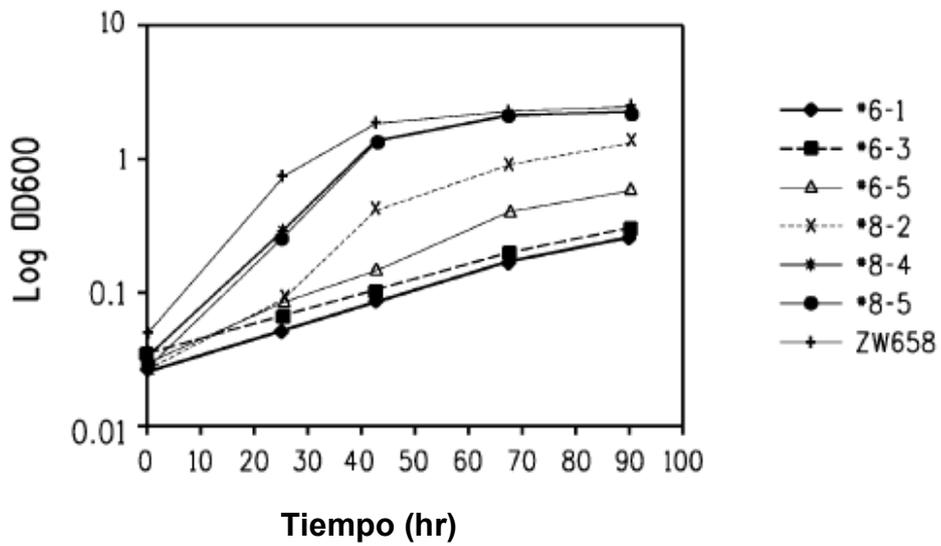


FIG. 13B

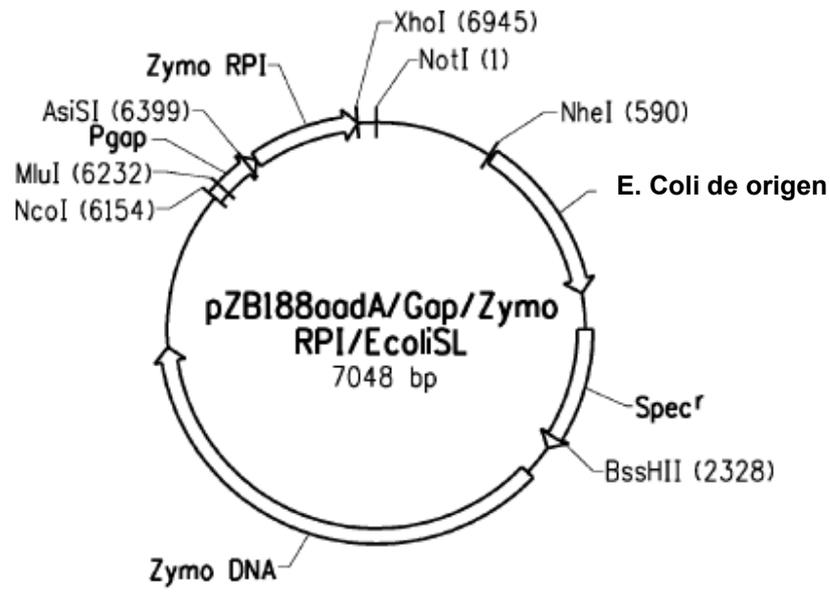
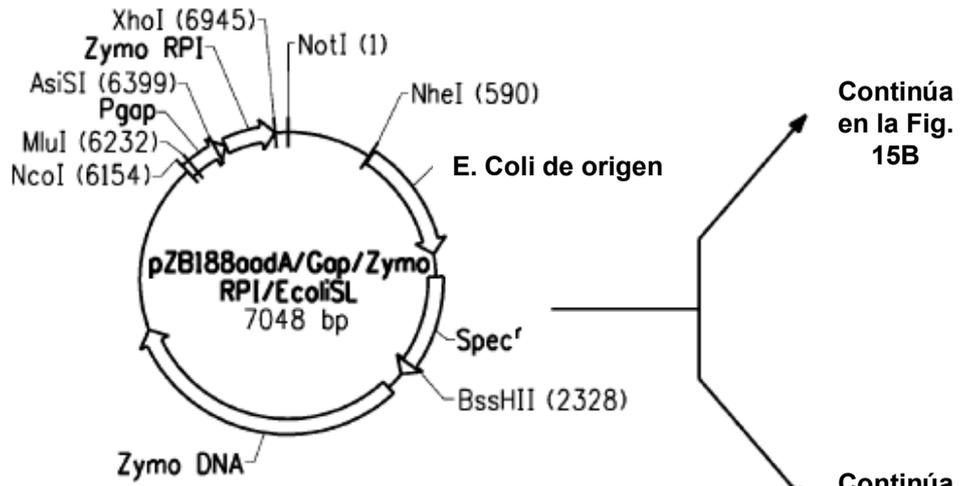


FIG. 14



Continúa
en la Fig.
15B

Continúa
en la Fig.
15C

FIG. 15A

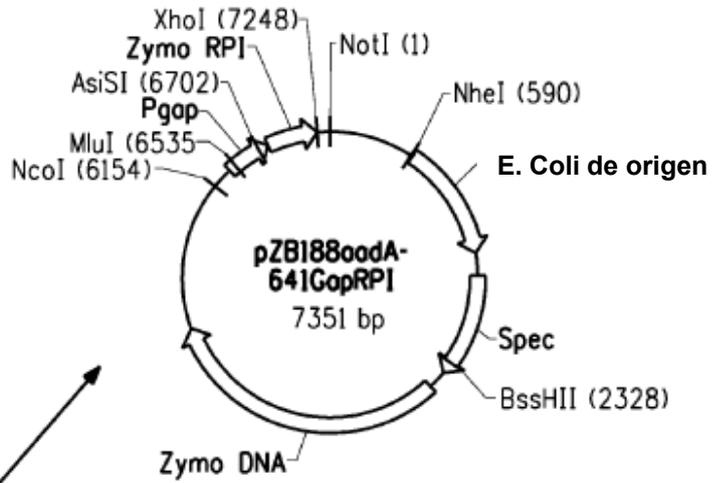


FIG. 15B

Continúa en la Fig. 15A

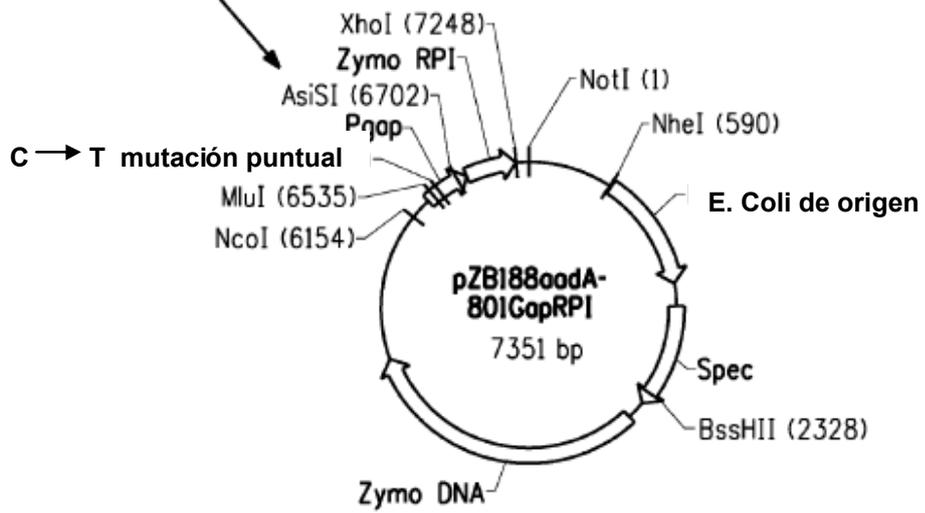
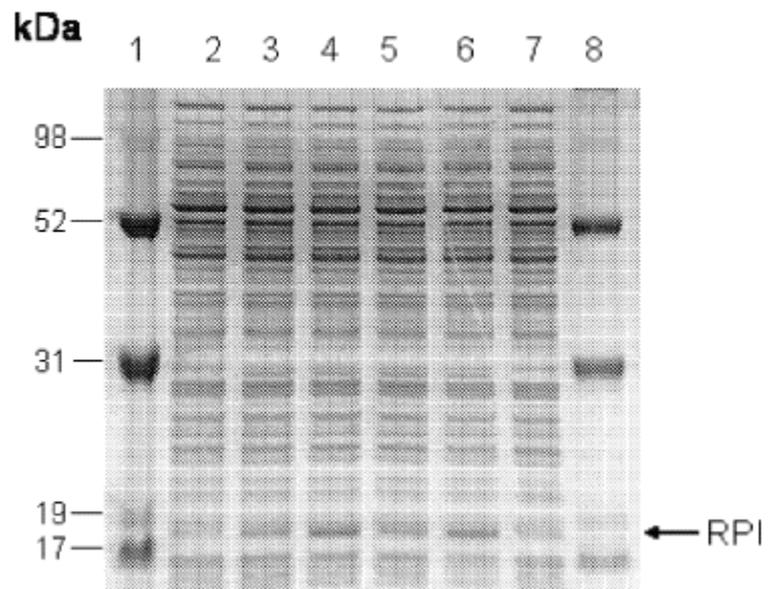


FIG. 15C



- 1 **Marcadores MW**
- 2: ZW1
- 3: 641gapRpi #1
- 4: 801gapRpi #1
- 5: 641gapRpi #2
- 6: 801gapRpi #2
- 7: ZW1
- 8: **Marcadores MW**

FIG. 16