

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 795**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2010 PCT/EP2010/056592**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10130806**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2010 E 10718614 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2430150**

54 Título: **Bacterias recombinantes y sus usos para producir etanol**

30 Prioridad:

14.05.2009 EP 09160284

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

20.11.2017

73 Titular/es:

**DEINOVE (100.0%)
Cap Sigma - ZAC Euromédecine II, 1682 rue de la
Valsière
34790 Grabels, FR**

72 Inventor/es:

**BITON, JACQUES y
GERBER, ESTHER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 642 795 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).

DESCRIPCION

Bacterias recombinantes y sus usos para producir etanol

5 La presente invención se refiere a bacterias recombinantes y a los usos de las mismas para la producción de etanol. La invención también se refiere a métodos para la producción de dichas bacterias, así como de construcciones de ácido nucleico adecuadas para dicha producción. La invención se refiere específicamente a bacterias que carecen de un gen de LDH funcional y/o que contiene un ácido nucleico recombinante que codifica una PDC o una ADH. Las bacterias de esta invención pueden ser producidas a partir de cualquier cepa de *Deinococcus*, incluyendo cepas extremófilas, tales como, sin limitación, *D. radiodurans*, *D. geothermalis*, *D. Murrayi*, *D. cellulosilyticus* o *D. deserti*.

Introducción

10 En bibliografía se han reportado bacterias que poseen la capacidad de reorganizar su genoma cuando son alteradas por estrés, tales como las bacterias *Deinococcus*. *Deinococcus* es una bacteria gram positiva que fue aislada en 1956 por Anderson y colaboradores. Este organismo extremófilo es resistente al daño del ADN por UV y radiaciones ionizantes, o por acción de un agente reticulante (mitomicina C), y es tolerante a la desecación.

15 El documento WO 01/023526 muestra la resistencia inusual de *Deinococcus* frente a la radiación y propone además su modificación genética y su uso en biorremediación. La solicitud de patente n° WO 2009/063079, no publicada en la fecha de prioridad de la presente solicitud, muestra que las bacterias de *Deinococcus* pueden resistir disolventes y transformar biomasa para generar etanol.

20 En la solicitud de patente n° EP 09 305041.7, actualmente no publicada, se describen otras bacterias resistentes a estrés, así como métodos para su aislamiento y/o selección, y su capacidad para producir metabolitos tales como antibióticos.

En los documentos WO 95/27064 y WO 2006/131734 se han mencionado cepas gram positivas modificadas genéticamente o de *Geobacillus*. Desde un punto de vista industrial, no se ha descrito una producción satisfactoria de metabolitos para estas cepas. Además, las cepas de *Geobacillus* producen esporas, lo cual supone un inconveniente sustancial para su uso industrial.

25 La presente invención muestra ahora que el genoma de bacterias resistentes a estrés, particularmente bacterias de *Deinococcus*, se puede modificar para mejorar su capacidad para producir etanol. Más específicamente, la presente invención muestra que es posible modificar las rutas metabólicas dentro de las bacterias resistentes a estrés, particularmente bacterias de *Deinococcus*, a fin de incrementar su actuación en la producción de etanol.

Sumario de la invención

30 La presente invención se ocupa de la materia objeto de las reivindicaciones.

La presente solicitud describe una bacteria recombinante resistente a estrés, en particular una bacteria *Deinococcus*, en donde dicha bacteria presenta un genoma modificado que contiene un gen de L-lactato deshidrogenasa (LDH) inactivo.

35 En un aspecto particular, el gen de LDH es eliminado, total o parcialmente, y no codifica una enzima lactato deshidrogenasa funcional.

La bacteria recombinante de esta invención comprende además una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una piruvato descarboxilasa (PDC) y una alcohol deshidrogenasa (ADH).

40 A este respecto, un objetivo adicional de esta invención es una bacteria *Deinococcus* recombinante, en donde dicha bacteria contiene un ácido nucleico recombinante que contiene un ácido nucleico que codifica una piruvato descarboxilasa y una alcohol deshidrogenasa.

45 Bacterias como las descritas en la presente memoria se pueden seleccionar de diferentes especies de bacterias resistentes a estrés, tales como las bacterias *Deinococcus*, las bacterias *Tepidimonas*, las bacterias *Truepera*, las bacterias *Porphyrobacter*, las bacterias *Novosphingobium* o las bacterias *Exiguobacterium*. Las bacterias de esta invención son bacterias *Deinococcus* tales como, sin limitación, *D. radiodurans*, *D. geothermalis*, *D. murrayi*, *D. cellulosilyticus* o *D. deserti*, preferiblemente una bacteria *Deinococcus* termófila.

Un objetivo adicional de esta invención reside en un método para producir etanol, que comprende cultivar una bacteria como las definidas anteriormente en presencia de un sustrato apropiado, y recolectar el etanol.

La invención también se refiere al uso de una bacteria como las definidas anteriormente para producir etanol.

50 La presente solicitud también describe un método para producir una bacteria recombinante resistente a estrés, en particular una bacteria *Deinococcus*, tal como se ha definido anteriormente, o un ancestro de la misma, método que comprende:

- proporcionar una bacteria (progenitora) resistente a estrés, particularmente una bacteria *Deinococcus*;
- tratar la bacteria para inactivar el gen de LDH, y
- seleccionar una bacteria que tenga un gen de LDH inactivado.

La invención también se refiere a un método para producir una bacteria *Deinococcus* recombinante, tal como se ha definido anteriormente, método que comprende:

- proporcionar una bacteria *Deinococcus* (progenitora);
- introducir en dicha bacteria una molécula de ácido nucleico recombinante que codifique una PDC y una ADH, y
- seleccionar una bacteria que exprese dicho ácido nucleico.

La presente solicitud también describe una construcción de plásmido, en donde dicho plásmido se replica en una bacteria *Deinococcus* y contiene un ácido nucleico que codifica una PDC y/o una ADH.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Construcción y estructura de la construcción integrativa pDR-LDHdel para la eliminación parcial de LDH. La inserción con regiones homólogas y la casete de cloranfenicol se sintetizaron y se clonaron en LITMUS28i. Cam^R, resistencia a cloranfenicol; Amp^R, resistencia a ampicilina; GDR_term85, terminador de transcripción de *Deinococcus radiodurans* putativo; P D. rad., promotor putativo de *Deinococcus radiodurans*; 5'HR, región homóloga 5'; 3'HR, región homóloga 3'; E. coli ORI, origen de replicación de *Escherichia coli*.

Figura 2: Secuencias de las regiones homólogas 5' (SEQ ID NO: 1) y 3' (SEQ ID NO: 2).

Figura 3: Proceso de construcción de mutantes de L-lactato deshidrogenasa (localización DR_2364) de *Deinococcus radiodurans* mediante recombinación homóloga. Cam^R, resistencia a cloranfenicol; Amp^R, resistencia a ampicilina; 5'HR, región homóloga 5'; 3'HR, región homóloga 3'; E. coli ORI, origen de replicación de *Escherichia coli*.

Figura 4: Secuencias de ácido nucleico de los genes ZmPDC (SEQ ID NO: 3) y ZmADH II (SEQ ID NO: 4).

Figura 5: Construcción y estructura de los plásmidos pI3-DR-P-PDC-ADH (a), pI3-DR-P-PDCtag-ADHtag (b), pI3-DR-P-PDC-P-ADH (c) y pI3-DR-P-PDCtag-P-ADHtag (d). Operón RBS groESL, región de sitio de unión ribosómica localizado por encima del operón groESL de *Deinococcus radiodurans* (Meima et al, 2001); Amp^R, resistencia a ampicilina; Cam^R, resistencia a cloranfenicol; E. coli ORI, origen de replicación de *Escherichia coli*; PtufA, 432 pb localizados por encima del codón de inicio traduccional predicho del gen tufA; PtufB, 234 pb localizados por encima del codón de inicio traduccional predicho del gen tufB; ZmPDC, gen de piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilis*; ZmADH, gen de alcohol deshidrogenasa II de *Zymomonas mobilis*; Term85, secuencia intergénica ubicada entre la localización DR_1184 y la DR_1185 que contiene un terminador de la transcripción putativo; Term116, terminador de la transcripción Term116 (Leconte et al, 2004); D. rad. ORI, origen replicativo de *Deinococcus radiodurans*; P D. rad., promotor de *Deinococcus radiodurans*.

Figura 6: Actividad de alcohol deshidrogenasa correspondiente a *D. radiodurans* transformada con pI3-DR-P-PDC-P-ADH (a) o pI3-DR-P-PDCtag-P-ADHtag (b).

Figura 7: Ruta metabólica rediseñada.

Figura 8: Ligación tripartita de productos de PCR para la creación del mutante PDC+ADH+LDH. Cam^R, resistencia a cloranfenicol; PtufA, 432 pb localizados por encima del codón de inicio traduccional predicho del gen TufA; PtufB, 234 pb localizados por encima del codón de inicio traduccional predicho del gen TufB; ZmPDC, gen de piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilis*; ZmADH, gen de alcohol deshidrogenasa II de *Zymomonas mobilis*; Term85, secuencia intergénica ubicada entre la localización DR_1184 y la DR_1185 que contiene un terminador de la transcripción putativo; Term116, terminador de la transcripción Term116 (Leconte et al, 2004); P D. rad., promotor de *Deinococcus radiodurans*; 5'HR, región homóloga 5'; 3'HR, región homóloga 3'.

Tabla 1: Nombre de los recombinantes usados para el análisis metabólico.

Tablas 2-5: Recombinantes de *Deinococcus*: producción de metabolitos en medio Complejo o Definido.

Descripción detallada de la invención

La presente solicitud describe bacterias recombinantes resistentes a estrés y los usos de las mismas para producir un biocombustible u otros metabolitos.

Dentro del contexto de esta invención, el término "bacteria resistente a estrés" designa más específicamente una bacteria que tiene la capacidad de reorganizar su genoma, total o parcialmente, cuando es alterada por un estrés. El

estrés puede provenir de cualquier tratamiento de destrucción celular que dañe el ADN, es decir, un tratamiento que sea suficiente para provocar la muerte del 90% de las células, o más, en un cultivo de bacterias de *E. coli*. Incluso más preferiblemente, el tratamiento destructor de células que daña el ADN es un tratamiento que es suficiente para reducir en al menos 2 log (dos unidades logarítmicas) el título bacteriano en un cultivo de *E. coli*. Los ejemplos de dicho tratamiento incluyen la irradiación, preferiblemente irradiación UV repetida y secuencia, y/o el uso de agentes genotóxicos. Un tratamiento de estrés preferido es un tratamiento de UV de entre 0,5 y 400 mJ/cm², más preferiblemente de entre 1 y 200 mJ/cm², típicamente entre 1 y 100 mJ/cm², aplicado durante un periodo de tiempo de aproximadamente 5" a 5'. Un tratamiento UV preferido es 4 mJ/cm² durante 30 segundos, que puede repetirse en un intervalo de entre 1 y 8 horas, preferiblemente de 3 a 5 horas, y más preferiblemente de aproximadamente 4 horas. Los tratamientos de estrés celular específicos según la invención han sido descritos en la solicitud de patente nº EP09 305041.

Las bacterias resistentes a estrés celular tal como se describen en la presente memoria incluyen más específicamente bacterias de *Deinococcus*, bacterias de *Tepidimonas*, bacterias de *Truepera*, bacterias de *Porphyrobacter*, bacterias de *Novosphingobium* o bacterias de *Exiguobacterium*. Las bacterias de esta invención son bacterias de *Deinococcus*, particularmente bacterias de *Deinococcus* extremófilas, más preferiblemente bacterias de *Deinococcus* seleccionadas entre *D. radiodurans*, *D. geothermalis*, *D. Murrayi*, *D. cellulosilyticus* o *D. deserti*, preferiblemente una bacteria *Deinococcus* termófila.

Se ha demostrado que las bacterias *Deinococcus* tiene la capacidad de reestructurar su genoma, total o parcialmente, cuando son alteradas por un estrés. Como se ha mencionado previamente, estas bacterias, particularmente *D. radiodurans*, han sido propuestas para biorremediación. La capacidad de las bacterias *Deinococcus* para producir productos bioenergéticos a partir de biomasa ha sido descrita en la patente WO2009/063079, no publicada en la fecha de prioridad de la presente solicitud. La presente invención demuestra ahora que la actuación de las bacterias resistentes a estrés, tales como las bacterias *Deinococcus*, puede mejorarse mediante el diseño de rutas metabólicas modificadas usando tecnologías recombinantes. Más particularmente, la presente solicitud describe nuevas bacterias resistentes a estrés recombinantes que presentan una ruta modificada para la biosíntesis de etanol.

A este respecto, los inventores han diseñado y creado nuevas rutas biosintéticas en cepas bacterianas resistentes a estrés, que se basan en reorientar la ruta de conversión de piruvato. Más particularmente, los inventores han diseñado nuevas cepas recombinantes en las que el piruvato es usado eficientemente como sustrato para producir etanol. En relación a esto, los inventores han insertado una o varias enzimas (o los genes correspondientes) que producen o catalizan la conversión de piruvato en etanol. Los inventores también han eliminado una ruta endógena que usa piruvato para producir lactato, aumentando de este modo las cantidades de piruvato implicadas en la ruta sintética de etanol.

De esta manera, la presente solicitud describe una bacteria resistente a estrés (recombinante o modificada genéticamente), particularmente una bacteria *Deinococcus*, en donde dicha bacteria contiene un ácido nucleico recombinante que codifica una PDC.

El término "bacteria recombinante" designa una bacteria que contiene un genoma modificado como resultado de una eliminación o de una inserción de una secuencia o molécula de ácido nucleico heteróloga (p.ej., no presente de forma natural en dicha bacteria). Por lo tanto, un "ácido nucleico recombinante" designa un ácido nucleico que ha sido modificado y que no se encuentra como tal en la bacteria natural.

La presente solicitud también describe una bacteria resistente a estrés (recombinante o modificada genéticamente), particularmente una bacteria *Deinococcus*, en donde dicha bacteria contiene un ácido nucleico recombinante que codifica una ADH.

La invención se refiere a una bacteria *Deinococcus* (recombinante o modificada genéticamente), en donde dicha bacteria contiene un ácido nucleico recombinante que codifica una PDC y una ADH.

La presente invención también describe una bacteria resistente a estrés (recombinante o modificada genéticamente), particularmente una bacteria *Deinococcus*, en donde dicha bacteria tiene un genoma modificado que contiene un gen de lactato deshidrogenasa (LDH) inactivo.

Un objetivo más preferido de esta invención es una bacteria *Deinococcus* (recombinante o modificada genéticamente), en donde dicha bacteria tiene un genoma modificado que contiene un gen de lactato deshidrogenasa (LDH) inactivo y en donde además dicha bacteria contiene un ácido nucleico recombinante que codifica una PDC o una ADH.

La piruvato descarboxilasa (PDC, EC : 4.1.1.1) cataliza la descarboxilación mono-oxidativa del piruvato a acetaldehído y dióxido de carbono. La alcohol deshidrogenasa (ADH, EC : 1.1.1.1) cataliza la conversión de acetaldehído a etanol.

Para crear o mejorar dicha ruta metabólica, se ha clonado una molécula de ácido nucleico que codifica una PDC y/o una ADH y se ha introducido con éxito en una bacteria resistente a estrés, particularmente una cepa de

Deinococcus. El término ácido nucleico designa preferiblemente ADN, aunque el ácido nucleico recombinante puede ser ARN. Dependiendo de la situación, la molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble.

5 Más particularmente, se ha preparado una molécula de ácido nucleico que codifica una PDC funcional. Dicha molécula de ácido nucleico puede comprender la totalidad o una porción de la secuencia de un gen de PDC natural o sintético o mutante, siempre que la molécula de ácido nucleico codifique una proteína que cataliza la descarboxilación mono-oxidativa de piruvato a acetaldehído y dióxido de carbono.

10 La PDC está presente en plantas, hongos y levaduras pero es raro encontrarla en bacterias. No se ha observado ninguna PDC aparente en el genoma de *D. radiodurans* que haya sido secuenciada completamente. Los genes de PDC han sido identificados en varias cepas, tales como en *Zymomonas mobilis* (Brau y Sahm, 1986; Conway et al, 1987a; Neale et al, 1987), en *Acetobacter pasteurianus* (Genbank: AF368435) (Chandra et al, 2001), en *Sarcina vantriculi* (Genbank: AF354297) (Lowe y Zeikus, 1992) y en *Zymobacter palmae* (Genbank: AF474145) (Raj et al, 2002).

15 En una realización preferida, el ácido nucleico de PDC comprende la secuencia de la totalidad o de parte de un gen de PDC bacteriano. En una realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia de un gen de PDC procedente de *Zymomonas mobilis* (ZmPDC, ZMO1360). La secuencia génica de ZmPDC comprende 1707 pares de bases y está representada por la Figura 4.

20 Adicionalmente, a fin de crear una actividad de ADH en bacterias resistentes a estrés tales como *Deinococcus*, se ha preparado una molécula de ácido nucleico que codifica una ADH funcional. Dicha molécula puede comprender la totalidad o una porción de la secuencia de un gen de ADH natural o sintético o mutante, siempre que la molécula de ácido nucleico codifique una proteína que catalice la conversión de acetaldehído en etanol.

25 Se han clonado genes de ADH a partir de diferentes organismos, que incluyen, sin limitación, *Zymomonas mobilis* (Ingram et al, 1987), *Lactobacillus brevis* (Liu et al, 2007), o *Geobacillus stearothermophilus* (Genbank: Z25544) (Talarico et al, 2005). También se ha encontrado un gen de ADH putativo (DR_2279) en el genoma de *D. radiodurans*. Sin embargo, la expresión del mismo, por sí solo, no parece permitir una producción suficiente de etanol.

30 En una realización preferida, el ácido nucleico de ADH comprende la secuencia de la totalidad o de una parte de un gen de ADH bacteriano. En una realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia de un gen de ADH de *Zymomonas mobilis* (ZmADH, ZMO1596). ZmADH II comprende 1152 pares de bases y la secuencia del mismo se muestra en la Figura 4.

35 Estos ácidos nucleicos pueden contener además secuencias o regiones reguladoras, tales como un promotor (p.ej., un promotor *tufB*) y un terminador, por ejemplo. El promotor puede ser endógeno al hospedante (p.ej., un promotor de un gen de *Deinococcus* para clonar un ácido nucleico recombinante de la invención en una cepa de *Deinococcus*) o heterólogo (p.ej., de un origen diferente, tal como una bacteria diferente, un fago, un promotor sintético o híbrido, etc.). Los promotores preferidos son endógenos. A este respecto, se han estudiado promotores de *Deinococcus* y se han usado para expresión génica. Los ejemplos de dichos promotores incluyen *PtufA* y *PtufB* de los genes *Tu* de factores de elongación de la traducción *tufA* (DR0309) y *tufB* (DR2050), el promotor del gen *resU* que codifica una resolvasa putativa localizada en *pl3*, y la región promotora *PgroESL* del operón *groESL* (Lecoite et al, 2004; Meima et al, 2001).

40 Los ácidos nucleicos se pueden clonar como entidades separadas (p.ej., construcciones de ácido nucleico distintas), o en una misma construcción, bajo distintas regiones promotoras o en operón.

45 Los ejemplos proporcionados en la presente solicitud describen la creación de nuevas construcciones en las que se clonó un gen ZmPDC y un gen de alcohol deshidrogenasa II de *Zymomonas mobilis* (ZmADH) en la misma construcción, tanto con promotores separados como en operón. Estas construcciones fueron introducidas con éxito en cepas de *Deinococcus*, lo que dio como resultado la producción de etanol a partir de dichas cepas recombinantes mientras que la cepa no modificada (progenitora) no produjo nada de etanol en las condiciones del ensayo.

El(los) ácido(s) nucleico(s) puede(n) insertarse en el genoma de la bacteria, o puede(n) insertarse como moléculas replicantes (autónomamente), p.ej., en un plásmido, episoma, cromosoma artificial, etc.

50 En una realización típica, el(los) ácido(s) nucleico(s) recombinante(s) es(son) clonado(s) en un vector adecuado, que puede ser replicativo en *Deinococcus*. Los plásmidos típicos contienen, además del inserto clonado, un gen de selección (p.ej., resistencia a antibiótico, un colorante, etc.) y un origen de replicación efectivo en *Deinococcus* o que permita la integración en el genoma de *Deinococcus*. El plásmido (o los ácidos nucleicos recombinantes) puede comprender además secuencias reguladoras, tales como por ejemplo promotores, terminadores y/o potenciadores.

55 Los ejemplos de dichos vectores incluyen pMD66, *pl3*, pRAD1 y pUE30. pMD66 es un vector grande (27 kb) para *D. radiodurans* y *E. coli* que contiene un fragmento de 12 kb de *pl3* (Daly et al, 1994). *pl3* fue descrito por Masters y Minton (1992). pRAD1 es un plásmido lanzadera de *D. radiodurans-E. coli* que contiene un replicón mínimo para *D.*

radiodurans (Meima y Lidstrom, 2000). pUE30 es un plásmido endógeno derivado de una cepa de *D. radiopugnans* que es capaz de replicarse en *Deinococcus* (véase US2003/0175977).

5 La presente solicitud describe una construcción de plásmido, en donde dicho plásmido se replica en una bacteria resistente al estrés, en particular una bacteria *Deinococcus*, y contiene un ácido nucleico que codifica una PDC y/o una ADH. Los ácidos nucleicos que codifican PDC y ADH pueden estar en operón o como unidades de expresión distintas en el mismo plásmido o en distintos plásmidos. Los plásmidos preferidos codifican una PDC y/o una ADH de *Zymomonas*. Los ejemplos específicos de plásmidos son pl3-DR-P-PDC-ADH, pl3-DR-P-PDCtag-ADHtag, pl3-P-PDC-P-ADH y pl3-DR-P-PDCtag-P-ADHtag.

10 El ácido nucleico recombinante también puede ser clonado en una casete integrativa adecuada para la integración en el genoma de una bacteria *Deinococcus*. Dicha casete integrativa comprende, habitualmente, el ácido nucleico recombinante unido a (o flanqueado por) una o varias secuencias que permitan la integración, preferiblemente una integración específica de sitio. Dichas secuencias pueden ser, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico homólogas a una región seleccionada del genoma, que permitan la integración por cruce. En este sentido, una bacteria particular de la invención comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una PDC y una ADH integrado en su genoma, en sustitución de la totalidad o parte del gen endógeno que codifica LDH. En este contexto, el término "parte del gen de LDH" significa cualquier porción del gen cuya eliminación sea suficiente para causar la inactivación del gen en la célula.

20 Se pueden usar diversas técnicas para insertar una molécula(s) de ácido nucleico recombinante en las bacterias resistentes a estrés, particularmente en *Deinococcus*. En particular, pueden insertarse mediante transformación natural (que puede ser potenciada adicionalmente en presencia de cloruro de calcio) o por electroporación.

En este aspecto, la invención también se refiere a un método para producir una bacteria de *Deinococcus* recombinante como la definida anteriormente, comprendiendo dicho método:

- proporcionar una bacteria de *Deinococcus* (progenitora);
- 25 - introducir en dicha bacteria una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una PDC y una ADH, y
- seleccionar una bacteria que expresa dicho ácido nucleico.

Los recombinantes que tiene los ácidos nucleicos insertados pueden seleccionarse según técnicas conocidas per se, tales como la resistencia a antibióticos.

30 La expresión de PDC o ADH apropiada puede verificarse usando PCR cuantitativa y la producción de dichas enzimas puede verificarse mediante Western blot o mediante ensayos enzimáticos conocidos per se en la técnica. La actividad de PDC se puede medir analizando la reducción de NAD⁺ y la actividad de ADH se puede medir analizando la reducción de NAD⁺ o la oxidación de NADH debida a la actividad de dichas enzimas (Conway et al, 1987a y b).

35 Tal como se ha descrito en la sección experimental, se han producido bacterias *Deinococcus* que contienen ácido nucleico recombinante que codifican una PDC y una ADH. Estas bacterias pueden ser cultivadas, son viables y contienen de forma estable el ácido nucleico recombinante. La estabilidad de los recombinantes preferiblemente es tal que más del 95% de las bacterias transformadas contienen todavía el vector tras 2 ciclos de crecimiento. Los resultados demuestran que la inserción genómica de PDC y ADH es estable incluso después de 2 ciclos de reacción.

40 Estas bacterias producen etanol y combinan muchas ventajas en términos de especificidad de sustrato, condiciones de cultivo y producción de metabolitos.

Adicionalmente, a fin de mejorar aún más la producción de etanol, también se han producido bacterias resistentes a estrés, en particular bacterias *Deinococcus*, en las que el gen de lactato deshidrogenasa se ha hecho inactivo.

45 El gen de LDH (lactato deshidrogenasa) está implicado en la conversión de piruvato en lactato. El gen de LDH de *D. radiodurans* fue clonado en 1996 por Narumi y Watanabe. Esta enzima es tetramérica y su estructura cristalográfica ha sido resuelta (Coquelle et al, 2007).

50 Los inventores han creado ahora una nueva bacteria en la que dicha enzima es inactiva. En una realización particular, el gen de LDH es eliminado, total o parcialmente, y no codifica una proteína funcional. El gen de LDH puede ser inactivado en dicha bacteria o en un ancestro de la misma, mediante recombinación homóloga, sustitución génica, o mutagénesis dirigida, o mediante cualquier técnica conocida per se en la técnica.

En una realización preferida, el gen de LDH es inactivado por eliminación de al menos una parte de dicho gen, que puede ser reemplazado por ácido nucleico heterólogo (p.ej., un marcador de selección).

El gen de LDH contiene 915 pares de bases. Está localizado entre las coordenadas 2362890 y 2363804 del genoma de *Deinococcus*. La secuencia de dicho gen está disponible, p.ej., en geneSeq1799712. En una realización preferida, la bacteria de la presente invención carece de una porción de dicho gen, preferiblemente al menos 100 nucleótidos consecutivos del mismo, más preferiblemente al menos 200, 300, 400 ó 500. En los ejemplos, se ha producido una cepa de *Deinococcus* con defecto, que carece de 589 nucleótidos consecutivos del gen de LDH. Dicha cepa ha sido preparada mediante doble cruce usando una construcción particular que comprende un gen marcador flanqueado por dos regiones homólogas a porciones del gen de LDH y (opcionalmente) a porciones de regiones que flanquean el gen de LDH (ver Figura 3). Las regiones homólogas típicas deberían ser suficientemente largas para permitir la hibridación y el cruce, p.ej., de más de 200 nucleótidos, preferiblemente de más de 300 nucleótidos, típicamente entre 300 y 700. Dichas construcciones se describen en la presente solicitud (ver las Figuras 1 y 2).

En relación a esto, la presente solicitud también describe un método para producir una bacteria resistente a estrés recombinante, particularmente una bacteria *Deinococcus* como se ha definido anteriormente, o un ancestro de la misma, comprendiendo dicho método:

- proporcionar una bacteria resistente a estrés (progenitora), particularmente una bacteria *Deinococcus*;
- tratar la bacteria para inactivar el gen de LDH, y
- seleccionar una bacteria que tenga un gen de LDH inactivado.

La bacteria de la presente invención puede cultivarse y/o mantenerse en cualquier medio de cultivo y dispositivo adecuados. Los ejemplos de dicho medio de cultivo incluyen medio de glucosa complejo o medio definido, tal como se describe en los ejemplos, tal como, p.ej., medio de sacarosa definido, medio de almidón definido. Los medios adecuados también se encuentran disponibles comercialmente.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere al uso de una bacteria como la definida anteriormente para producir etanol.

La presente solicitud también describe un método para producir un biocombustible, particularmente etanol, que comprende cultivar una bacteria como se ha definido anteriormente en presencia de un sustrato apropiado, y recoger el biocombustible. La invención se refiere a un método para producir etanol que comprende cultivar una bacteria como la definida anteriormente en presencia de un sustrato apropiado, y recolectar el etanol.

El sustrato puede ser cualquier medio de cultivo o los diversos tipos de biomasa o productos derivados del mismo. En particular, el biocombustible puede ser producido a partir de fuentes renovables, especialmente biomasa vegetal o animal, o a partir de residuos municipales e industriales.

El término biocombustible según la invención comprende "biocombustible de primera generación" y/o "biocombustible de segunda generación". Los biocombustibles de primera generación se obtienen a partir de materia orgánica vegetal o animal, preferiblemente a partir de azúcar, almidón, aceite vegetal o grasa animales. La materia prima principal para la producción de los biocombustibles de primera generación son plantas comestibles o partes de las mismas. Los biocombustibles de primera generación incluyen aceite vegetal, biodiesel, bioalcoholes, biogás, gas de síntesis y biocombustibles sólidos. Los bioalcoholes incluyen etanol, propanol y butanol. Los biocombustibles de segunda generación se producen preferiblemente a partir de plantas no comestibles o partes no comestibles de plantas. Incluyen cultivos no comestibles, residuos de biomasa, tallos de trigo, maíz y madera.

El método de la invención se usa para la producción de etanol.

El método de la invención puede llevarse a cabo en un reactor de conversión. "Reactor" pretende indicar un tanque de fermentación convencional o cualquier aparato o sistema para la conversión de biomasa diseñado especialmente para implementar la invención, y que por tanto consiste en particular en biorreactores, biofiltros, contactores biológicos rotatorios, y otros biorreactores de fase gas y/o líquida, especialmente aquellos adaptados para el tratamiento de biomasa o de derivados de la biomasa. El aparato utilizable de acuerdo a la invención puede usarse en continuo o por cargas.

En el reactor, para implementar el método de la invención, se usa al menos una bacteria de la invención, o un extracto bacteriano de la misma, mientras que dicho reactor se suministra y se dispone de tal manera que se fijan las condiciones fisicoquímicas y se mantienen para que dicha bacteria sea operativa para la aplicación en consideración, y de tal modo que, opcionalmente, sea posible el crecimiento bacteriano y preferiblemente se promueva en su interior.

El proceso puede llevarse a cabo en aerobiosis, anaerobiosis o microaerobiosis, dependiendo del sustrato y de la bacteria. Una ventaja de la invención se refiere a la capacidad de las bacterias de la invención para resistir condiciones de estrés, que incluyen la presencia de etanol en el medio de cultivo. De esta manera, el proceso de la invención preferiblemente puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 40°C o más,

particularmente a una temperatura comprendida entre 40-70°C; en condiciones de pH ácido, y/o en presencia de etanol.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en los siguientes ejemplos, que deberían ser considerados a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de esta solicitud.

5 **EJEMPLOS**

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento:

10 Se usaron las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) SCS110, JM109 o DH5α para propagar plásmidos. Se cultivaron a 37°C y 200 RPM en Caldo Luria-Bertani (LB) (por litro: triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, cloruro sódico 10 g). Se preparó el medio sólido mediante la adición de Agar al 1,5%.

15 Se cultivó *Deinococcus radiodurans* R1 (*D. radiodurans*) a 30°C y 200 RPM en TGY o PGY. La composición del medio TGY es la siguiente, por litro: triptona (5 g), extracto de levadura (1,5 g) y glucosa (1 g). La composición del medio sólido es, por litro: triptona (5 g), extracto de levadura (2,5 g), glucosa (1 g) y agar (15 g). La composición del medio PGY es la siguiente, por litro: peptona (10 g), extracto de levadura (5 g) y glucosa (1 g). La composición del medio sólido es, por litro: peptona (10 g), extracto de levadura (5 g), glucosa (1 g) y agar (15 g).

Los medios LB o TGY fueron suplementados, en caso de ser necesario, con los antibióticos apropiados (cloranfenicol en una concentración final de 3 µg/mL para los transformantes de *D. radiodurans* y ampicilina 100 µg/mL para los transformantes de *E. coli*).

Transformación:

20 La transformación de *E. coli* se realizó usando células competentes comerciales SCS110 de Stratagene o JM109 de Promega.

25 Para la preparación de células competentes de *D. radiodurans*, se diluyó un cultivo fresco en fase estacionaria 100 veces en 50 mL de TGY. Las células fueron crecidas hasta la fase exponencial temprana ($DO_{600nm} = 0,3$); la partícula celular fue resuspendida en un volumen apropiado de 2xTGY/10%v/v Glicerol/CaCl₂ 30 mM enfriado en hielo. Para la transformación, se añadió la cantidad deseada de plásmido a 100 µL de las células. La mezcla se incubó 30 minutos en hielo antes de que los tubos fueran transferidos a 30°C. Después de 90 minutos de incubación a 30°C, se añadieron 900 µL de 2xTGY pre-calentado a las células. Los transformantes fueron agitados a 200 RPM y a 30°C durante 20 horas. Fueron diluidos en serie y distribuidos en placas de TGY apropiadas selectivas o no selectivas.

30 Manipulación de ADN:

LITMUS28i procede de New England Biolabs.

35 La minipreparación de plásmido de células de *E. coli* se realizó usando el kit de sistema de purificación de ADN Wizard®Plus SV minipreps de Promega y la midipreparación se realizó usando el kit de purificación de ADN de plásmido NucleoBond® Xtra Midi Plus EF de Macherey-Nagel. Estas preparaciones se realizaron a partir de 3-100 mL de cultivo de *E. coli* en fase estacionaria.

40 Para la preparación de plásmidos de *D. radiodurans*, se resuspendieron 50 mL de células en fase estacionaria en EDTA 0,5 M y en butanol saturado en EDTA 0,5 M. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la partícula se resuspendió en EDTA 0,5 M y las células fueron colocadas a 70°C durante 30 minutos. La partícula se lavó dos veces en tampón de lisozimas (Tris HCl 10 mM, EDTA 5 mM, NaCl 0,5 M) antes de la adición de lisozimas a 5 mg/mL (en tampón de lisozimas). La muestra se incubó durante 30 minutos a 37°C antes de la adición de ARNasa y proteinasa K. La mezcla se incubó durante 1 hora a 56°C. A continuación se añadió NaOH 200 mM a la muestra que fue invertida varias veces para mezclar; se añadió acetato potásico 3M a la muestra que fue invertida para mezclar; la mezcla se incubó durante 10 minutos en hielo antes de añadir etanol al sobrenadante; dicha mezcla se incubó durante 10 minutos en hielo y la partícula se lavó con etanol al 70%. La partícula de ADN secada fue resuspendida en agua.

La extracción de ADN genómico de *D. radiodurans* se realizó usando el kit comercial DNeasy® Blood and Tissue de Qiagen. Dichas preparaciones fueron realizadas a partir de cultivos de 5 mL de fase estacionaria.

50 Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Eurogentec. Las polimerasas usadas para la amplificación de PCR fueron la ADN polimerasa DyNAzyme EXT de Finnzymes o la Enzima de PCR Extensor Hi-Fidelity de Thermo Scientific. Los fragmentos de PCR fueron lavados usando gel Wizard SV y el kit PCR Clean-Up System de Promega.

Para la ligación de ADN se usó T4 ADN ligasa (New England Biolabs).

Los productos de ADN plasmídico o de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción de New England Biolabs.

El material genético (productos de PCR o de digestión) fue separado mediante electroforesis de gel de agarosa. El ADN se cuantificó con un Biofotómetro de Eppendorf.

Los insertos de ADN fueron sintetizados por Genecust Europe y se clonaron en el vector apropiado.

5 Ensayo de actividad de alcohol deshidrogenasa:

Se añadieron 4 mL de pararosanilina (Sigma) a 2,5 mg/mL en etanol absoluto a 200 mL de agar LB que contenían 50 mg de bisulfito sódico (Conway et al., 1987b). Se colocaron células de dos días de *D. radiodurans* crecidas en placas de TGY agar (suplementado cuando sea necesario con el antibiótico apropiado) sobre placas indicadoras y se incubaron a 37°C durante de 2 a 3 horas.

10 Producción de metabolitos:

Este método permite la evaluación de la capacidad de microorganismos modificados genéticamente para producir metabolitos de interés a partir de biomasa o de un derivado de biomasa.

El ensayo se lleva a cabo a 30°C.

15 A partir de los pre-cultivos (en fase estacionaria) preparados en medio Complejo de Glucosa, se sembraron 6 mL de medio enriquecido (siembra a 1% v/v).

Los medios de cultivo enriquecidos evaluados son Medio Complejo de Glucosa, Medio Definido de Sacarosa, Medio Definido de Almidón.

20 El Medio Complejo de Glucosa contiene: peptona 2 g/L, extracto de levadura 5 g/L y glucosa 10 g/L en agua osmotizada: disolución esterilizada mediante autoclavado (15 minutos a 120°C). A esta disolución se añaden las siguientes disoluciones: disolución tampón MOPS (10X) pH 7 [MOPS ácido 400 mM, NH₄Cl 200 mM, NaOH 100 mM, KOH 100 mM, CaCl₂ 5 µM, Na₂SO₄ 2,76 mM, MgCl₂ 5,28 mM]; micronutrientes (10000X) [(NH₄)₆(Mo₇)₂₄ 300 mM, H₃BO₃ 4 mM, CoCl₂ 0,3 mM, CuSO₄ 0,1 mM, MnCl₂ 2,5 mM, ZnSO₄ 0,1 mM]; FeCl₃ (100X) 2 mM en C₆H₅Na₃O₇ 20 mM; K₂HPO₄ 1 g/L: disoluciones esterilizadas mediante filtración (0,2 µm).

25 El Medio Definido contiene: fuente de carbono 10 g/L en agua osmotizada: disolución esterilizada mediante autoclavado (15 minutos a 120°C). A esta disolución se añaden las siguientes disoluciones: disolución tampón MOPS (10X) pH 7 [MOPS ácido 400 mM, NH₄Cl 200 mM, NaOH 100 mM, KOH 100 mM, CaCl₂ 5 µM, Na₂SO₄ 2,76 mM, MgCl₂ 5,28 mM]; micronutrientes (10000X) [(NH₄)₆(Mo₇)₂₄ 300 mM, H₃BO₃ 4 mM, CoCl₂ 0,3 mM, CuSO₄ 0,1 mM, MnCl₂ 2,5 mM, ZnSO₄ 0,1 mM]; FeCl₃ (100X) 2 mM en C₆H₅Na₃O₇ 20 mM; K₂HPO₄ 1 g/L: disoluciones esterilizadas mediante filtración (0,2 µm).

30 A estos medios de cultivo, excepto para las cepas naturales, se añadió cloranfenicol antes de la siembra: 3 µg/mL de medio de cultivo.

Los cultivos se llevan a cabo tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Biomerieux, Genbag).

35 Los cultivos en condiciones de aerobiosis se dejan en una incubadora, a 30°C, con agitación, durante 7 días. A continuación los cultivos son centrifugados durante 10 minutos a 4000 rpm. Los sobrenadantes se filtran (0,2 µm), se vierten en otros tubos, y se llevan a -80°C.

Los cultivos en condiciones de anaerobiosis se dejan en una incubadora, a 30°C, durante 4 semanas. A continuación los cultivos son centrifugados durante 10 minutos a 4000 rpm. Los sobrenadantes se filtran (0,2 µm), se vierten en otros tubos, y se llevan a -80°C.

40 Se usó análisis de Cromatografía de Gases con FID (Varian CP-WAX 57 CB columna de 25m*0,32 mm) para cuantificar los alcoholes. Los ácidos orgánicos fueron cuantificados mediante Electroforesis Capilar (ácido 2,6-piridindicarboxílico 5 mM, bromuro de cetiltrimetilamonio 0,5 mM; pH 5,6 ajustado con tampones / capilar Agilent de 61 cm de longitud, 50 µm de diámetro). La glucosa residual se cuantificó mediante HPLC acoplado a refractometría (columna Phenomenex LUNA 3 µm NH₂ 100A de 150*4,6 mm, fase móvil acetonitrilo/H₂O 85:15).

Ejemplo 1: Eliminación de L-lactato deshidrogenasa (LDH) de *Deinococcus radiodurans* R1

45 Los mutantes de LDH de *Deinococcus radiodurans* R1 (*D. radiodurans*) natural fueron producidos como se indica a continuación.

a. Construcción para eliminación de LDH (pDR-LDHdel)

50 Creamos una nueva construcción denominada pDR-LDHdel para la eliminación parcial del gen LDH (DR_2364) en *D. radiodurans* natural (ver Figura 1). Para ello, usamos la cadena principal LITMUS28i que es replicativa en *E. coli* pero no en *D. radiodurans*. Se clonó en LITMUS28i un inserto de ADN sintetizado; dicho inserto está constituido por

una casete de resistencia a cloranfenicol (Cam^R) (1344 nucleótidos) y regiones homólogas flanqueantes 5' y 3' (537 nucleótidos y 615 nucleótidos) ubicadas respectivamente por encima y por debajo de dicha casete (Figura 2). La construcción pDR-LDHdel se construyó para reemplazar 589 nucleótidos del gen de LDH (algunos de los 589 nucleótidos codifican residuos implicados en la catálisis) por la casete Cam^R.

5 b. Creación de mutantes deficientes en LDH

D. radiodurans natural fue transformada con pDR-LDHdel siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, a fin de crear mutantes bloqueados. Los transformantes fueron seleccionados en medio TGY suplementado con cloranfenicol. La sustitución de parte del gen de LDH por la casete de resistencia a cloranfenicol (Figura 3) se controló mediante PCR usando cebadores apropiados para incorporar la casete de cloranfenicol. Se seleccionaron dos clones integrantes de cruce doble denominados 03-04/8-1 y 03-04/11-2 para el análisis de metabolitos (Tabla 1).

Tras una recombinación homóloga, la bacteria resultante contiene una eliminación de 589 nucleótidos, que son reemplazados por la casete Cam^R. Las regiones genómicas de 03-04/8-1 y 03-04/11-2 en las que parte del gen de LDH había sido reemplazado por la casete Cam^R fueron secuenciadas parcialmente.

15 **Ejemplo 2. Producción de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa en *D. radiodurans***

Se crearon cepas de *D. radiodurans* que producen piruvato descarboxilasa (ZmPDC) y alcohol deshidrogenasa (ZmADH) a partir de *Zymomonas mobilis* como se indica a continuación.

a. Creación de construcciones que portan genes para la producción de etanol

Se crearon cuatro construcciones con el objetivo de producir etanol en células de *D. radiodurans* (ver la Figura 2).

20 Para la primera construcción denominada pI3-DR-P-PDC-ADH, el gen de piruvato descarboxilasa (ZmPDC, ZMO1360) y el gen de alcohol deshidrogenasa II (ZmADH, ZMO1596) procedente de *Zymomonas mobilis subsp. Mobilis ZM4* (Figura 4) fueron colocados en operón y clonados en *BamHI* y *Sall* del plásmido pI3 replicativo de *D. radiodurans* (Masters y Minton, 1992) (ver Figura 5). El vector pI3 confiere resistencia a cloranfenicol en *D. radiodurans*. Una región de 432 pares de bases localizada por encima del codón de inicio traduccional del factor de elongación TU tufA (DR_0309) y que contiene una actividad promotora (Lecoite et al, 2004) fue colocado antes del operón de ZmPDC-ADH. Un espaciador está presente entre los genes ZmPDC y ZmADH con una secuencia de unión ribosómica (RBS) del operón de *D. radiodurans* groESL (Meima et al, 2001) colocado antes del codón de inicio traduccional de ZmADH. El terminador de la transcripción de *D. radiodurans* Term116 (Lecoite et al, 2004) se colocó por debajo del gen ZmADH. Se creó una segunda construcción derivada de pI3-DR-P-PDC-ADH y se denomina pI3-DR-P-PDCtag-ADHtag. En esta construcción, se colocó una his-tag (6 histidinas) en el extremo C de ZmPDC y se colocó una etiqueta c-myc (EQKLISEEDL) en el extremo C de ZmADH (Figura 5).

35 Para la construcción pI3-DR-P-PDC-P-ADH, se colocó una región que contenía un terminador de la transcripción putativo denominado Term85 por debajo del gen ZmPDC y los 234 nucleótidos localizados por encima del codón de inicio traduccional del factor de elongación TU tufB (DR_2050) (que corresponde a la región promotora tufB, Lecoite et al, 2004) se ubicaron entre Term85 y el gen ZmADH (Figura 5). La última construcción se deriva de pI3-P-PDC-P-ADH y se denomina pI3-DR-P-PDCtag-P-ADHtag; y en este vector, se colocó una etiqueta his (6 histidinas) en el extremo C del gen ZmPDC y se colocó una etiqueta c-myc (EQKLISEEDL) en el extremo C del gen ZmADH (Figura 5).

b. Creación de cepas de *D. radiodurans* que producen ZmPDC y ZmADH

40 Células competentes de *D. radiodurans* fueron transformadas con las diferentes construcciones que portan los genes ZmPDC y ZmADH. Los transformantes fueron seleccionados para resistencia de cloranfenicol. La presencia del plásmido se controló mediante amplificación de PCR con cebadores específicos o con digestiones enzimáticas de la construcción extraída de los clones de *D. radiodurans*. Para cada una de las 4 construcciones, se usaron dos clones para estudios metabólicos (Tabla 1).

45 **Ejemplo 3. Creación de mutantes de LDH integrativos de *Deinococcus radiodurans* que producen ZmPDC y ZmADH**

Se reemplazaron 589 nucleótidos del gen de LDH (DR_2364) en la *D. radiodurans* natural por una casete de resistencia a cloranfenicol seguida de los genes ZmPDC y ZmADH, respectivamente bajo el control de promotores *PtufA* y *PtufB*.

50 Para crear este mutante PDC+ADH+LDH-, las siguientes 3 secuencias de nucleótidos fueron amplificadas mediante PCR:

- la región homóloga flanqueante 5' seguida de una casete de resistencia a cloranfenicol fue amplificada con los cebadores EG31F y EG32R (ver la lista a continuación) usando pDR-LDHdel como plantilla

- la secuencia P-PDC-P-ADH fue amplificada con los cebadores EG33F y EG34R (ver la lista a continuación) usando pI3-P-PDC-P-ADH como plantilla
- la región homóloga flanqueante 3' fue amplificada con los cebadores EG35F y EG36R (ver la lista a continuación) usando pDR-LDHdel como plantilla

5 Lista de cebadores:

EG31F	SEQ ID NO : 5	5'-TTCCCCGCCTGGGTATCACGTC-3'
EG32R	SEQ ID NO : 6	5'-CTCGGATCCTTCACAGTTCTCCGCCCTCC-3'
EG33F	SEQ ID NO : 7	5'-GAGGGATCCGTCGGGTGTCGAGCATCGTGATC-3'
EG34R	SEQ ID NO : 8	5'-CCTCCTGCAGTTGTTTTGCAATAAACAAAAACAAAAAACCCCC-3'
EG35F	SEQ ID NO : 9	5'-GAGACTGCAGTGGAACGAGCAGGTGCGCGCC-3'
EG36R	SEQ ID NO : 10	5'-ACGCGTGAGCAAAGGGCGGCG-3'

10 El producto de ligación de estos 3 amplicones se usó para transformar *D. radiodurans* para obtener el mutante PDC+ADH+LDH- (Figura 8). Los transformantes fueron seleccionados para resistencia de cloranfenicol. La eliminación parcial del gen LDH, la inserción genómica del gen de resistencia a cloranfenicol y los genes ZmPDC y ZmADH se controlaron usando los cebadores apropiados. Se seleccionaron dos clones integrantes de cruce doble denominados 18-06/1-1 y 18-06/1-3 para el análisis de metabolitos (Tablas 1 y 4).

Ejemplo 4. Recombinantes de *Deinococcus radiodurans* R1: actividad de alcohol deshidrogenasa

15 Determinamos la producción de aldehído y la actividad de ADH con un ensayo colorimétrico según Conway y colaboradores (1987b) en diferentes recombinantes transformados con plásmidos que tienen los genes ZmPDC y ZmADH. Este ensayo se basa en la formación de una base de Schiff violeta tras interacción del acetaldehído producido por ADH a partir de etanol y un colorante leuco. Tal como se muestra en la Figura 6, los recombinantes de esta invención se colorean de violeta tras 2-3 horas de incubación a 37°C en placas de agar LB suplementado con etanol, pararosanilina y bisulfito sódico. Esta coloración demuestra una actividad de ADH en todos los clones de los
20 recombinantes transformados con el plásmido pI3-DR-P-PDC-P-ADH o pI3-DR-P-PDCtag-P-ADHtag. En estos recombinantes, la transcripción del gen ZmADH se controló mediante el promotor tufB.

Ejemplo 5. Recombinantes de *Deinococcus radiodurans* R1: producción de metabolitos.

Se analizaron los metabolitos producidos por los recombinantes de la invención.

25 Pudimos detectar un cambio en los metabolitos producidos por los recombinantes de esta invención (p.ej., los clones 24-03/4-2, 03-04/4-1, 03-04/4-2), en comparación con el natural o el recombinante de control transformado con el vector de imitación de cadena principal pI3 (ver las Tablas 2-5). En particular, se detectó una producción de etanol, en diferentes condiciones de cultivo, mientras que la cepa progenitora no produce etanol.

Tabla 1: Nombre de los recombinantes

Cepa transformada	Construcción replicativa o integrativa	Nombre de los clones
<i>D. radiodurans</i> R1	No hay construcción	24-03/1-2 03-04/1-1 20-04/1-2
<i>D. radiodurans</i> R1	pDR-LDHdel	03-04/8-1 03-04/11-2
<i>D. radiodurans</i> R1	pI3	24-03/2-2 03-04/2-1 20-04/3-1
<i>D. radiodurans</i> R1	pI3-DR-P-PDCtag-ADHtag	24-03/4-2 24-03/5-2
<i>D. radiodurans</i> R1	pI3-DR-P-PDC-ADH	20-04/4-3 20-04/5-4
<i>D. radiodurans</i> R1	pI3-DR-P-PDCtag-P-ADHtag	03-04/5-1 03-04/6-1

Cepa transformada	Construcción replicativa o integrativa	Nombre de los clones
<i>D. radiodurans</i> R1	pl3-DR-P-PDC-P-ADH	03-04/4-1 03-04/4-2
<i>D. radiodurans</i> R1	Productos de PCR	18-06/1-1 18-06/1-3

Tabla 2: Recombinantes de *Deinococcus radiodurans* R1: producción de metabolitos en Medio Complejo de Glucosa ("CM") en condiciones de cultivo de aerobiosis

Cepa	Clon	Producción de ácido (g/L)			Etanol (%) [*]	Glucosa consumida (g/L)
		Succinato	Acetato	Lactato		
Drad R1 WT	24-03/1-2	0,43	0,21	0	0	0
Drad R1 pl3	24-03/2-2	0,43	0,23	0	0	0,6
Drad R1 pl3 DR-P-PDCtag-ADH tag	24-03/4-2	0,31	0,17	0	0,005	1,2
Drad R1 WT	03-04/1-1	0,42	0,2	0	0	0
Drad R1 pl3	03-04/2-1	0,37	0,2	0	0	0,9
Drad R1 pl3 DR-P-PDC-P-ADH	03-04/4-1	0,25	0,14	0	0,016	0,2
Drad R1 pl3 DR-P-PDC-P-ADH	03-04/4-2	0,27	0,14	0,02	0,016	0,2
Drad R1 pl3 DR-P-PDCtag-P-ADH tag	03-04/5-1	0,29	0,11	0	0,006	0,4
Drad R1 pl3 DR-P-PDCtag-P-ADH tag	03-04/6-1	0,33	0,14	0	0,006	0,3
Drad R1 pDR-LDHdel		0,28	0,18	0	0	0,4
Drad R1 pDR-LDHdel		0,33	0,39	0	0	0

* % de etanol designa g de etanol por g de medio de cultivo (es decir, típicamente 1% de etanol = 1 g de etanol / 100 g de medio = 10 g de etanol/L).

5

Para cada clon, los cultivos se llevan a cabo por triplicado.

Tabla 3: Recombinantes de *Deinococcus radiodurans* R1: producción de metabolitos en Medio Complejo de Glucosa ("CM") en condiciones de cultivo de aerobiosis

	Producción de ácido (g/L)				
	succinato	acetato	lactato	etanol (%)	glucosa consumida (g/L)
Drad R1 natural	0,66	0,64	0	0	3,13
Drad R1 pl3 (plásmido vacío)	0,53	0,41	0	0	1,77
Drad R1 pl3 DR-P-PDC-ADH	0,46	0,51	0	0,005	1,8
Drad R1 pl3 DR-P-PDC-ADH	0,49	0,5	0	0,006	1,85

Para cada clon, los cultivos se llevan a cabo por triplicado.

10

Tabla 4: Recombinantes de *Deinococcus radiodurans integrativa* R1: producción de metabolitos en Medio Complejo de Glucosa ("CM") en condiciones de cultivo de aerobiosis

	Producción de ácido (g/L)				
	succinato	acetato	lactato	etanol (%)	glucosa consumida (g/L)
Drad R1 natural	0,44	0,53	0,32	0	0,55
Drad R1 CamR PDC+ADH+LDH-	0,46	0,55	0	0,026	0,6
Drad R1 CamR PDC+ADH+LDH-	0,4	0,4	0	0,026	1,08

Para cada clon, los cultivos se llevan a cabo por triplicado.

Tabla 5: Recombinantes de *Deinococcus radiodurans* R1: producción de metabolitos en Medio Definido de Sacarosa (“DM”) en condiciones de cultivo de aerobiosis

	Producción de ácido (g/L)				
	succinato	acetato	lactato	formiato	etanol (%)
Drad R1 natural	0,02	0,11	0,03	0,04	0
Drad R1 pl3	0,02	0,11	0,03	0,04	0
Drad R1 pl3 DR-P-PDC-P-ADH	0	0	0	0	0,009
Drad R1 pl3 DR-P-PDC-P-ADH	0,02	0,13	0	0	0,012
Drad R1 pl3 DR-P-PDCtag-P-ADHtag	0,01	0,17	0,07	0	0,007
Drad R1 pl3 DR-P-PDCtag-P-ADHtag	0	0,05	0	0	0,007

- 5 Por tanto, estos resultados demuestran que la producción de etanol puede ser inducida o incrementada en bacterias resistentes a estrés diseñando nuevas rutas metabólicas. Los resultados muestran además que las cepas con defecto de LDH son viables, y que la inactivación de dicho gen aumenta adicionalmente la producción de etanol en las bacterias de la invención. Asimismo, los resultados demuestran que las cepas pueden usar diferentes tipos de sustratos y ser cultivadas en diferentes tipos de medio de cultivo para producir etanol.
- 10 De esta manera, las cepas recombinantes de esta invención combinan las ventajas de la resistencia a estrés, las condiciones de cultivo, la aceptación de sustrato y la producción de metabolitos.

Bibliografía

- Anderson AW, Nordon HC, Cain RF, Parrish G, Duggan D (1956) Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. **Food Technol.** 10, 575-578
- 5 Brau B y Sahn H (1986) Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. **Arch Microbiol.** 144, 296-301
- Chandra Raj K, Ingram LO, Maupin-Furlow JA. (2001) Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. **Arch Microbiol.** 176, 443-451
- Conway T, Osman YA, Konnan JI, Hoffmann EM, Ingram LO (1987a) Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. **J Bacteriol** 169, 949-954
- 10 Conway T, Sewell GW, Osman YA, Ingram LO (1987b) Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. **J Bacteriol.** 169, 2591-2597
- Coquelle N, Fioravanti E, Weik M, Vellieux F, Madern D (2007) Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments. **J Mol Biol** 374, 547-562
- 15 Daly MJ, Ouyang L, Fuchs P, Minton KW (1994) In vivo damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. **J Bacteriol.** 176, 3508-3517
- Ingram LO, Conway T, Clark DP, Sewell GW, Preston JF (1987) Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol.** 53, 2420-2425
- Lecoq F, Coste G, Sommer S, Bailone A (2004) Vectors for regulated gene expression in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. **Gene** 336, 25-35
- 20 Liu S, Dien BS, Nichols NN, Bischoff KM, Hughes SR, Cotta MA. (2007) Coexpression of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase genes in *Lactobacillus brevis*. **FEMS Microbiol Lett.** 274, 291-297
- Lowe SE y Zeikus JG (1992) Purification and characterization of pyruvate decarboxylase from *Sarcina ventriculi*. **J Gen Microbiol.** 138, 803-807
- 25 Masters CI y Minton KW (1992) Promoter probe and shuttle plasmids for *Deinococcus radiodurans*. **Plasmid** 28, 258-261
- Meima R y Lidstrom ME (2000) Characterization of the minimal replicon of a cryptic *Deinococcus radiodurans* SARK plasmid and development of versatile *Escherichia coli*-*D. radiodurans* shuttle vectors. **Appl Environ Microbiol.** 66, 3856-3867
- 30 Meima R, Rothfuss HM, Gewin L, Lidstrom ME (2001) Promoter cloning in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. **J Bacteriol.** 183, 3169-3175
- Narumi I y Watanabe H (1996) Sequence analysis of the L-lactate dehydrogenase-encoding gene of *Deinococcus radiodurans*, a suitable mesophilic counterpart for Thermus. **Gene** 172, 117-119
- Neale AD, Scopes RK, Wettenhall RE, Hoogenraad NJ. (1987) Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis*. **Nucleic Acids Res.** 15, 1753-1761
- 35 Raj KC, Talarico LA, Ingram LO, Maupin-Furlow JA. (2002) Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene (pdc) and comparison to bacterial homologues. **Appl Environ Microbiol.** 68, 2869-2876
- Talarico LA, Gil MA, Yomano LP, Ingram LO, Maupin-Furlow JA. (2005) Construction and expression of an ethanol production operon in Gram-positive bacteria. **Microbiol.** 151, 4023-4031
- 40

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> DEINOVE	
	<120> Bacterias recombinantes y sus usos para producir etanol	
5	<130> B881PC	
	<160> 10	
10	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	<211> 537	
	<212> ADN	
15	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Genoma de D. radiodurans R1_ Secuencias de 5'	
20	<400> 1	
	ttccccgect gggatcacg tccccgccag agccgctctg taccttcggg gcatgacca 60	
	gcccgtttct tcggttcccc gctettccct ttccggcgca ggttttcage gactgctggt 120	
	cgggatcgat ttctcgccct cgtcgttgca cgccctttaa gtggcgcgga cccgctttcc 180	
	cggcgcgcgg ctgcggctcg cccacgtgac cgacgcccg cgggtggcgg ctcccgcagt 240	
	gggtggcggg gtcacgccga tcatgcccga cccggggctg ctgcaaaccg tcgaagaccg 300	
	cgattccaac cggctctcgg ggctgatccg cgacggtgag gaaagcgagc tgctcgtcgg 360	
	cgatcccata acggggctgc tcgacgcggc ccgggcgtgg ggcgcgacc tgatcgtggt 420	
	cggcacccac ccgcaggcg cgctggaaca ctttttcata ggagcagcg ccgagaagct 480	
	gggtggcggc agcgcgggtg cgggtgctgt cgtgccctcg ggagcacaca gatgaaa 537	
	<210> 2	
	<211> 615	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Genoma de D. radiodurans R1_ Secuencias de 3'	
30	<400> 2	
	tggaacgagc aggtgcgcgc caaaatcgat gagggcaccc gcaacgccgc cgccagcacc 60	
	atcgagggca agcggggccac ctactacggc atcggcgcgg cgtctgcccc catcaccgag 120	
	gccgtgctgc gtgaccgccg cgccgtcctg accgtcagtg cgccgacccc cgaatacggc 180	
	gtgagcctca gcctgccgcg tgctcgtggc cgtcaggggg tgctgtccac cctgcacccc 240	
	aagctgaccg gcgacgagca acagaagctg gaacagagtg ccggggtgct gcgcggcttc 300	
	aagcagcagc tcggcctgtg acgcccagc tccagaccgt ctacggcgag gcgcagccgc 360	
	tcgactggct gtgcctcgcc ccccacccc acgacgccga aatcggcgcg ggcggcacgc 420	
	tgatccggct ggcgcaggcg ggccgggcag tggggattct ggaactcacg cgcggtgaaa 480	

ES 2 642 795 T3

agggcaccca ggggacgccc gccgagcggc aggccgagtg cgtggcggcg gcccgctga 540
 tggacctgag ctggcgcggc caactcgggc tgcccgatgg ggaactcgcc gacacgccgc 600
 cctttgctca cgcgt 615

<210> 3
 <211> 1707
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico de gen ZmPDC

<400> 3
 atgagttata ctgtcggtag ctatntagcg gagcggcttg tccagattgg tctcaagcat 60
 cacttcgcag tcgcggggcga ctacaacctc gtccttcttg acaacctgct tttgaacaaa 120
 aacatggagc aggtttattg ctgtaacgaa ctgaaactgc gtttcagtgc agaaggttat 180
 gctcgtgcc aaggcgcagc agcagccgct gttacctaca gcgtcgggtgc gctttccgca 240
 tttgatgcta tcgggtggcg ctatgcagaa aaccttccgg ttatcctgat ctccgggtgct 300
 ccgaacaaca atgatcacgc tgctggtcac gtgttgcatc acgctcttgg caaaaccgac 360
 tctactatc agttggaaat ggccaagaac atcacggccg ccgctgaagc gatttacacc 420
 ccggaagaag ctccgggctaa aatcgatcac gtgattaaaa ctgctcttcg tgagaagaag 480
 ccggtttatc tcgaaatcgc ttgcaacatt gcttccatgc cctgcgccgc tectggaccg 540
 gcaagcgc atgttcaatga cgaagccagc gacgaagctt ctttgaatgc agcggttgaa 600
 gaaaccctga aattcatcgc caaccgcgac aaagttgccg tectcgtcgg cagcaagctg 660
 cgcgcagctg gtgctgaaga agctgctgct aaatttgctg atgctctcgg tggcgcagtt 720
 gctaccatgg ctgctgcaaa aagcttcttc ccagaagaaa acccgatta catcggcacc 780
 tcatggggtg aagtcagcta tccgggcgtt gaaaagacga tgaaagaagc cgatgcgggtt 840
 atcgtcttgg ctctgtctt caacgactac tccaccactg gttggacgga tattcctgat 900
 cctaagaaac tggttctcgc tgaaccgct tctgtcgtcg ttaacggcat tcgcttcccc 960
 agcgtccatc tgaaagacta tctgaccctg ttggctcaga aagtttccaa gaaaaccggt 1020
 gcattggact tcttcaaact cctcaatgca ggtgaactga agaaagccgc tccggctgat 1080
 ccgagtgtc cgttgggtcaa cgcagaaatc gcccgctcagg tcgaagctct tctgaccccg 1140
 aacacgacgg ttattgctga aaccggtgac tcttggttca atgctcagcg catgaagctc 1200
 ccgaacggtg ctccggttga atatgaaatg cagtggggtc acattggttg gtccgttctt 1260
 gccgccttcg gttatgccgt cgggtgctccg gaacgtcgca acatcctcat ggttgggtgat 1320
 ggttccttcc agctgacggc tcaggaagtc gctcagatgg ttgcctgaa actgcgggtt 1380
 atcatcttct tgatcaataa ctatggttac accatcgaag ttatgatcca tgatggtccg 1440
 tacaacaaca tcaagaactg ggattatgcc ggtctgatgg aagtgttcaa cggtaaccggt 1500

ES 2 642 795 T3

ggttatgaca gcggtgctgg taaaggcctg aaggctaaaa cgggtggcga actggcagaa 1560
 gctatcaagg ttgctctggc aaacaccgac ggccaaccc tgatcgaatg cttcatoggt 1620
 cgtgaagact gactgaaga attggtcaaa tggggtaagc gcggtgctgc cgccaacagc 1680
 cgtaagcctg ttaacaagct cctctag 1707

 <210> 4
 <211> 1152
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 10 <223> Secuencia de ácido nucleico de gen ZmADH II

 <400> 4
 atggcttctt caacttttta tattcctttc gtcaacgaaa tgggcgaagg ttcgcttgaa 60
 aaagcaatca aggatcttaa cggcagcggc tttaaaaatg cgctgatcgt ttctgatgct 120
 ttcattgaaca aatccgggtg tgtgaagcag gttgctgacc tgttgaaagc acagggattt 180
 aattctgctg tttatgatgg cgttatgccg aaccgcactg ttaccgcagt tctggaaggc 240
 cttaagatcc tgaaggataa caattcagac ttcgcatctt ccctcgggtg tggttctccc 300
 catgactgcy ccaaagccat cgctctggtc gcaaccaatg gtggtgaagt caaagactac 360
 gaaggtatcg acaaatctaa gaaacctgcc ctgcctttga tgtcaatcaa cacgacggct 420
 ggtacggctt ctgaaatgac gcgtttctgc atcatcactg atgaagtccg tcacgttaag 480
 atggccattg ttgaccgtca cgttaccccg atggtttccg tcaacgatcc tctgttgatg 540
 gttggtatgc caaaaggcct gaccgccgcc accggtatgg atgctctgac ccacgcattt 600
 gaagcttatt cttcaacggc agctactccg atcaccgatg cttgcgcttt gaaagcagct 660
 tccatgatcg ctaagaatct gaagaccgct tgcgacaacg gtaaggatat gccggctcgt 720
 gaagctatgg cttatgccca attcctcgtt ggtatggcct tcaacaacgc ttcgcttggg 780
 tatgtccatg ctatggctca ccagttgggc ggttactaca acctgccgca tgggtgtctgc 840
 aacgctgttc tgettcgcga tgttctggct tataacgcct ctgtcgttgc tggctcgtctg 900
 aaagacgctg gtgttctgat gggctctgat atcgccaatc tcgggtgataa agaaggcgca 960
 gaagccacca ttcaggctgt tcgcgatctg gctgcttcca ttggtattcc agcaaacctg 1020
 accgagctgg gtgctaagaa agaagatgtg ccgcttcttg ctgaccacgc tctgaaagat 1080
 gcttgtgctc tgaccaaccc gcgtcagggt gatcagaaag aagttgaaga actcttctg 1140
 agcgttttct aa 1152

 <210> 5
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 20 <223> EG31F

 <400> 5
 ttccccgct ggtatcacg tc 22

 25 <210> 6

ES 2 642 795 T3

<211> 31
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5 <220>
<223> EG32R

<400> 6
ctcggatcct tcacagtct cgcgccctc c 31

10 <210> 7
<211> 32
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15 <220>
<223> EG33F

<400> 7
20 gagggatccg tcgggtgctg agcatcgtga tc 32

<210> 8
<211> 45
<212> ADN
25 <213> secuencia artificial

<220>
<223> EG34R

30 <400> 8
cctcctgcag ttgttttgc aataaacaaa aacaaaaaaaa ccccc 45

<210> 9
<211> 31
35 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> EG35F

40 <400> 9
gagactgcag tggaacgagc aggtgcgcg c 31

<210> 10
45 <211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
50 <223> EG36R

<400> 10
acgcgtgagc aaagggcggc g 21

55

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria *Deinococcus* recombinante que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una piruvato descarboxilasa (PDC) y una alcohol deshidrogenasa (ADH), estando integrada dicha construcción de ácido nucleico recombinante en el genoma de la bacteria.
- 5 2. La bacteria de la reivindicación 1, en donde los ácidos nucleicos de PDC y ADH se ubican en la misma construcción de operón.
3. La bacteria de la reivindicación 1 ó 2, en donde los ácidos nucleicos de PDC y ADH proceden de *Zymomonas*.
4. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha bacteria tiene un genoma modificado que contiene un gen de lactato deshidrogenasa (LDH) inactivo.
- 10 5. La bacteria de la reivindicación 4, en donde el gen ha sido eliminado, total o parcialmente, y no codifica una proteína funcional.
6. La bacteria de la reivindicación 4 ó 5, en donde el gen de LDH ha sido inactivado en dicha bacteria o en un ancestro de la misma mediante recombinación homóloga, reemplazamiento génico, o mutagénesis dirigida.
- 15 7. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el genoma de dicha bacteria carece de al menos 589 nucleótidos consecutivos del gen de LDH.
8. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la bacteria se selecciona entre *D. radiodurans*, *D. geothermalis*, *D. murrayi*, *D. cellulosilyticus* o *D. deserti*, preferiblemente una bacteria *Deinococcus* termofílica.
- 20 9. Un método para producir etanol que comprende cultivar una bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en presencia de un sustrato apropiado, y recolectar el etanol.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 40°C o más, en condiciones de pH ácido, y/o en presencia de etanol.
11. El uso de una bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para producir etanol, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 40°C o más, o en condiciones de cultivo de pH ácido.
- 25 12. Un método para producir una bacteria *Deinococcus* recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, método que comprende:
 - Proporcionar una bacteria *Deinococcus* que tiene la capacidad de reestructurar su genoma, total o parcialmente, cuando es alterada por un tratamiento destructor de células que daña el ADN;
 - Introducir en dicha bacteria *Deinococcus* seleccionada, una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una PDC y una ADH;
 - Opcionalmente, tratar adicionalmente la bacteria para inactivar el gen de LDH y elegir una bacteria que tiene un gen de LDH inactivado.
- 30

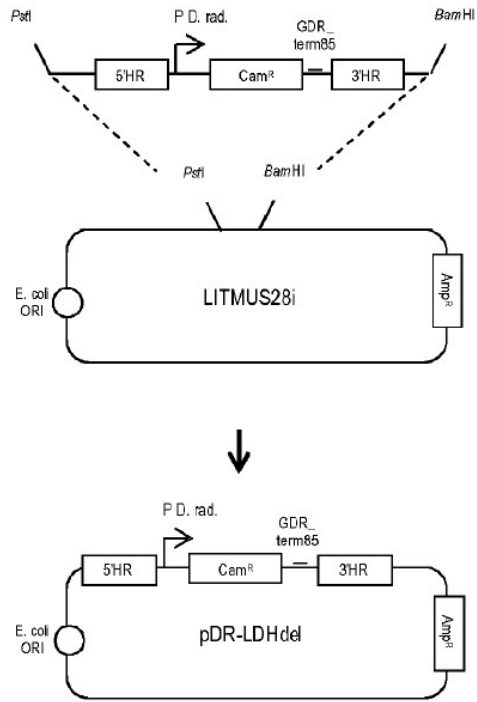


Figura 1

(a) Coordenadas genómicas de *D. radiodurans* R1: 2362359 a 2362895

TTCCCCGCCTGGGTATCACGTCCCCGCCAGAGCCGCTCTGTACCTTCGGGGCATGACCCA
GCCCCGTTTTCTTCGGTTCCCGGCTCTTCCCTTTCCGGCGCAGGTTTTTCAGCGACTGCTGGT
CGGGATCGATTTCTCGCCCTCGTCGTTGCACGCCCTTGAAGTGGCGCGGACCCGCTTTCC
CGGCGCGCGGCTGCGGCTCGCCACGTGACCGACGCCCGCGCGGTGGCGGCTCCCGACGT
GGTGGCGGGCGTCACGCCGATCATGCCCGACCCGGGGCTGCTGCAAACGCTCGAAGACGC
CGATTCCAACCGGCTCTCGGGGCTGATCCGCGACGGTGAGGAAAGCGAGCTGCTCGTCCG
CGATCCCATCACGGGGCTGCTCGACGCGGCCCGGGCGTGGGGCGCGGACCTGATCGTGGT
CGGCACCCACCCGCGAGGGCGCGCTGGAACACTTTTTTCATCGGCAGCAGCGCCGAGAAGCT
GGTGGGCCGCGAGCGCGGTGCCGGTGTGTGCGTGCCCTCGGGAGCACACAGATGAAA

(b) Coordenadas genómicas de *D. radiodurans* R1: 2363484 a 2364098

TGGAACGAGCAGGTGCGCGCCAAAATCGATGAGGGCACCCGCAACGCCGCCGCGCCAGCATCATCG
AGGGCAAGCGGGCCACCTACTACGGCATCGGCGCGGCGCTCGCCCGCATCACCGAGGCCGTGCT
GCGTGACCGCCGCGCCGTCTGACCGTCAGTGCGCCGACCCCGAATACGGCGTGAGCCTCAGC
CTGCCGCGTGTGCTGGGCCGTGAGGGGGTGTGTCCACCCTGCACCCCAAGCTGACCGGCGACG
AGCAACAGAAGCTGGAACAGAGTGCCGGGGTGTGCGCGGCTTCAAGCAGCAGCTCGGCCTGTG
ACGCCGACGCTCCAGACCGTCTACGGCGAGGCGCAGCCGCTCGACTGGCTGTGCCCTGCCCCC
ACCCCGACGACGCCGAAATCGGCGCGGGCGGCACGCTGATCCGGCTGGCGCAGGCGGGCCGGGC
AGTGGGGATTCTGGAACCTCACGCGCGGTGAAAAGGGCACCCAGGGGACGCCCGCGAGCGGCAG
GCCGAGTGCGTGGCGGCGGCCCGCCTGATGGACCTGAGCTGGCGCGGCCAACTCGGGCTGCCCC
ATGGGGAACCTCGCCGACACGCCGCCCTTTGCTCACGCGT

Figura 2

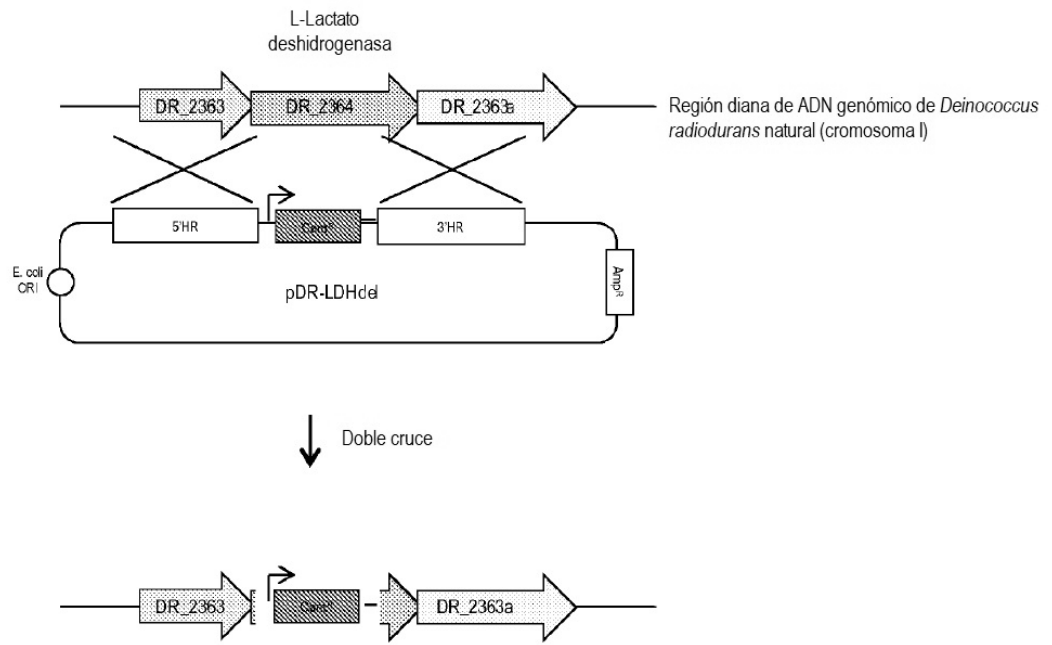


Figura 3

Figura 4

Secuencias de ZmPDC (a) y ZmADH II (b)

(a) Coordenadas genómicas de *Zymomonas mobilis subsp. Mobilis* ZM4: 1375111 a 1373405

ATGAGTTATACTGTCGGTACCTATTTAGCGGAGCGGCTTGTCAGATTGGTCTCAAGCATCACTTCGCAG
 TCGCGGGCGACTACAACCTCGTCTTCTTGACAACCTGCTTTTGAACAAAAACATGGAGCAGGTTTATTG
 CTGTAACGAACTGAACTGCGGTTTCAGTGCAGAAGGTTATGCTCGTGCCAAAGGCGCAGCAGCAGCCGTC
 GTTACCTACAGCGTCGGTGCGCTTCCGCATTTGATGCTATCGGTGGCGCCTATGCAGAAAACCTTCCGG
 TTATCCTGATCTCCGGTGTCCGAACAACAATGATCACGCTGCTGGTCACGTGTTGCATCACGCTCTTGG
 CAAAACCGACTATCACTATCAGTTGAAAATGGCCAAGAACATCACGGCCCGCCTGAAGCGATTTACACC
 CCGGAAGAAGCTCCGGCTAAAATCGATCACGTGATTAAACTGCTCTTTCGTGAGAAGAAGCCGGTTTATC
 TCGAAATCGCTTGCAACATTGCTTCCATGCCCTGCGCCGCTCCTGGACCGCAAGCGCATTTGTTCAATGA
 CGAAGCCAGCGACGAAGCTTCTTTGAATGCAGCGGTTGAAGAAAACCTGAAATTCATCGCCAACCGCGAC
 AAAGTTGCCGTCCTCGTTCGGCAGCAAGCTGCGCCAGCTGGTGCTGAAGAAGCTGCTGTCAAATTTGCTG
 ATGCTCTCGGTGGCGCAGTTGCTACCATGGCTGCTGCAAAAAGCTTCTTCCCAGAAGAAAACCCGCATTA
 CATCGGACACCTCATGGGGTGAAGTCAGCTATCCGGGCGTTGAAAAGACGATGAAAAGAAGCCGATGCGGTT
 ATCGCTCTGGCTCCTGTCTTCAACGACTACTCCACCCTGGTTGGACGGATATTCTGATCCTAAGAAAC
 TGGTCTCGTGAACCGGTTCTGTGTCGTTAACGGCATTGCTTCCCCAGCGTCCATCTGAAAGACTA
 TCTGACCCGTTTGGCTCAGAAAGTTTCCAAGAAAACCGGTGCATTGGACTTCTTCAAATCCCTCAATGCA
 GGTGAAGTGAAGAAAGCCGCTCCGGCTGATCCGAGTGTCCGTTGGTCAACGCAGAAATCGCCCCGTCAGG
 TCGAAGCTCTTCTGACCCCGAACACGACGGTTATGCTGAAACCGGTGACTCTTGGTTCAATGCTCAGCG
 CATGAAGCTCCCGAACGGTGTCTGCGTTGAATATGAAATGCAGTGGGGTCACATTGGTTGGTCCGTTCCCT
 GCCGCTTCGGTTATGCCGTGGTGTCCGGAACGTGCAACATCCTCATGGTTGGTGTGTTCCCTTCC
 AGCTGACGGCTCAGGAAGTCGCTCAGATGGTTCGCCTGAAACTGCCGGTTATCATCTTCTTGATCAATAA
 CTATGGTTACACCATCGAAGTTATGATCCATGATGGTCCGTACAACAACATCAAGAATGGGATTATGCC
 GGTCTGATGGAAGTGTTC AACGGTAAACGGTGGTTATGACAGCGGTGCTGGTAAAGGCCGAAGGCTAAAA
 CCGGTGGCGAACGGCAGAAGCTATCAAGGTTGCTCTGGCAAACACCGACGGCCCAACCTGATCGAATG
 CTTTATCGGTGCTGAAGACTGCACTGAAGAATTGGTCAAATGGGGTAAGCGGTTGCTGCCGCCAACAGC
 CGTAAGCCTGTTAACAAGCTCCTCTAG

Figura 4 - continuación

(b) Coordenadas genómicas de *Zymomonas mobilis subsp. Mobilis* ZM4: 1634679 a 1635830

ATGGCTTCTTCAACTTTTTATATTCCTTTCGTCAACGAAATGGGCGAAGGTTTCGCTTGAAAAAGCAATCA
 AGGATCTTAACGGCAGCGGCTTTAAAAATGCGCTGATCGTTTCTGATGCTTTCATGAACAAATCCGGTGT
 TGTGAAGCAGGTTGCTGACCTGTTGAAAGCACAGGTATTAATTCTGCTGTTTATGATGGCGTTATGCCG
 AACCCGACTGTTACCGCAGTTCCTGGAAGGCCTTAAGATCCTGAAGGATAACAATTCAGACTTCGTCATCT
 CCTCGGTGGTGGTTCTCCCATGACTGCGCCAAAGCCATCGCTCTGGTCGCAACCAATGGTGGTGAAGT
 CAAAGACTACGAAGGTATCGACAAATCTAAGAAACCTGCCCTGCCTTTGATGTCAATCAACACGACGGCT
 GGTACGGCTTCTGAAATGACCGTTCCTGCATCATCACTGATGAAGTCCGTCACGTTAAGATGGCCATTG
 TTGACCGTACGTTACCCCGATGGTTTCCGTCAACGATCCTCTGTTGATGGTTGGTATGCCAAAAGGCCT
 GACCGCCGCCACCGGTATGGATGCTCTGACCCACGCATTTGAAGCTTATTCCTCAACGGCAGCTACTCCG
 ATCACCGATGCTTTCGCTTTGAAAGCAGCTTCCATGATCGCTAAGAATCTGAAGACCGCTTGCGACAACG
 GTAAGGATAIGCCGGCTCGTGAAGCTATGGCTTATGCCCAATTCCTCGCTGGTATGGCCTTCAACAACGC
 TTCGCTTGGTTATGTCCATGCTATGGCTCACCAGTTGGGCGGTTACTACAACCTGCCGCATGGTGTCTGC
 AACGCTGTTCTGCTTCCGCATGTTCTGGCTTATAACGCCTCTGTGCTTGCCTGGTCGCTGAAAGACGTTG
 GTGTTGCTATGGGTCTCGATATCGCCAATCTCGGTGATAAAGAAGGCGCAGAAGCCACCATTGAGGCTGT
 TCGCGATCTGGCTGCTTCCATTGGTATTCAGCAAACCTGACCGAGCTGGGTGCTAAGAAAGAAGATGTG
 CCGCTTCTTGCTGACCACGCTCTGAAAGATGCTTGTGCTCTGACCAACCCGCGTCAGGGTGATCAGAAAAG
 AAGTTGAAGAACTCTTCTGAGCGCTTCTAA

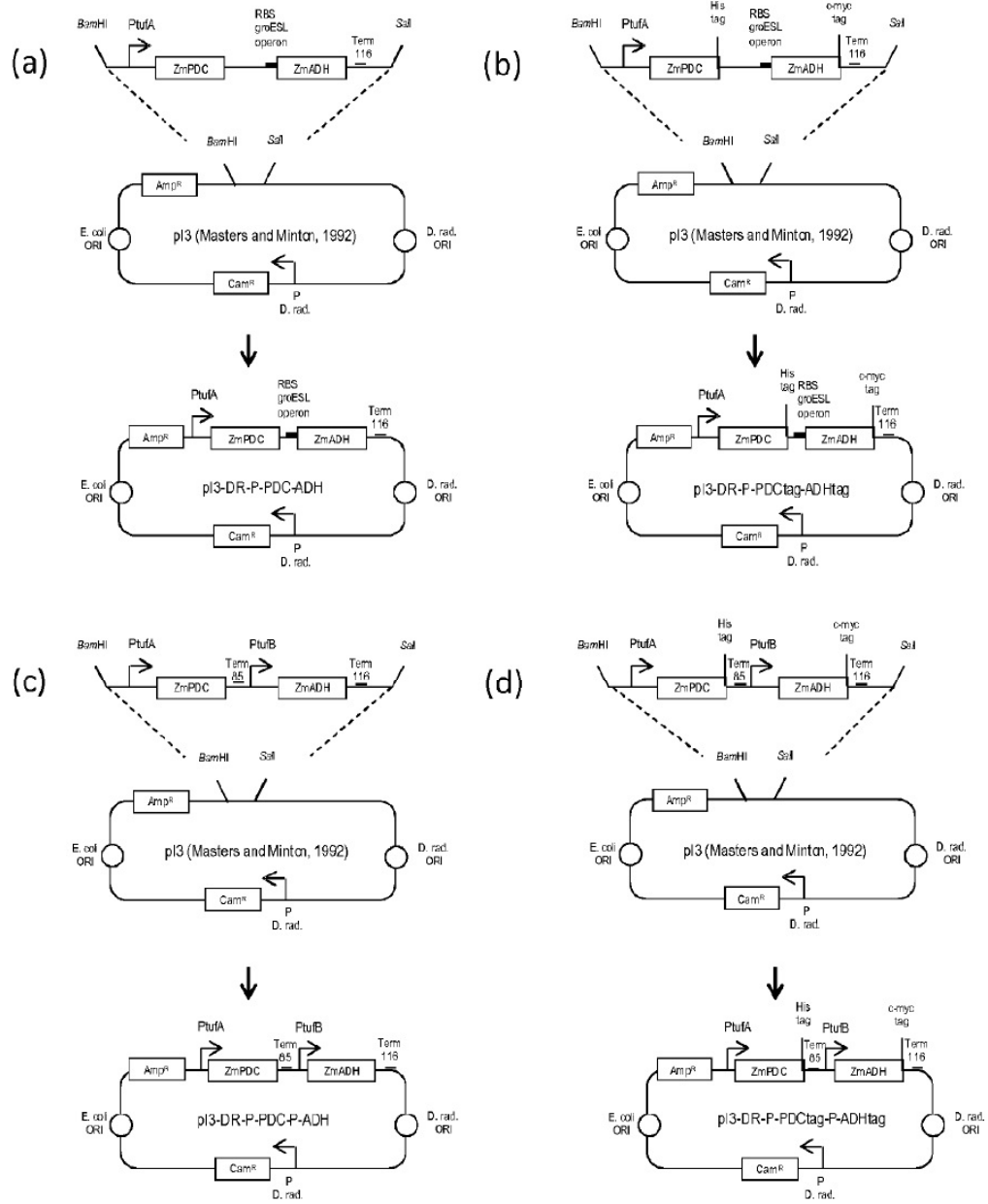


Figura 5

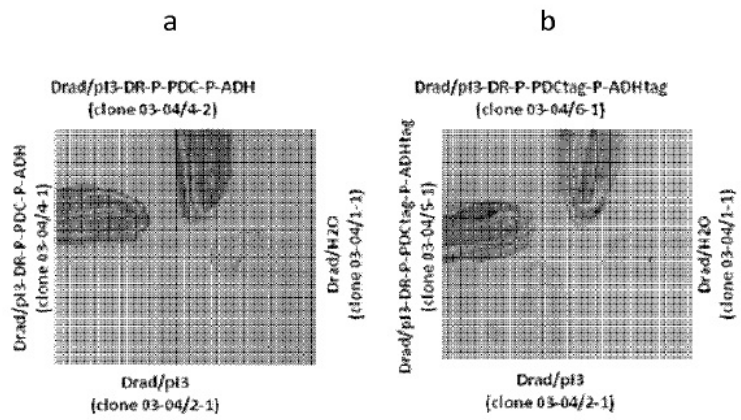


Figura 6

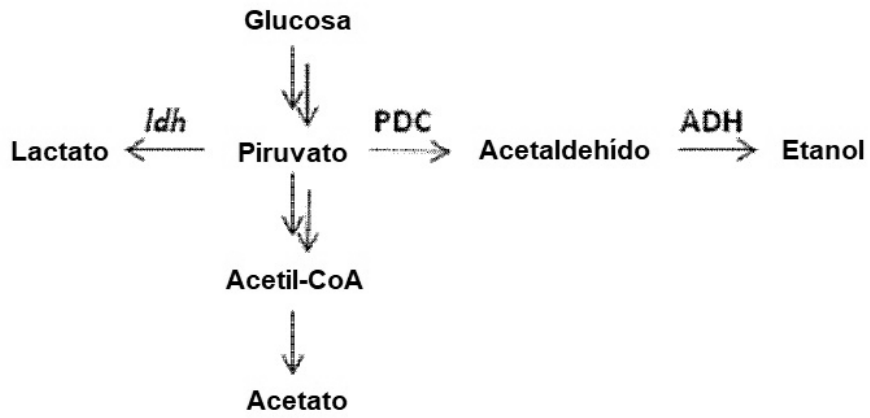


Figura 7

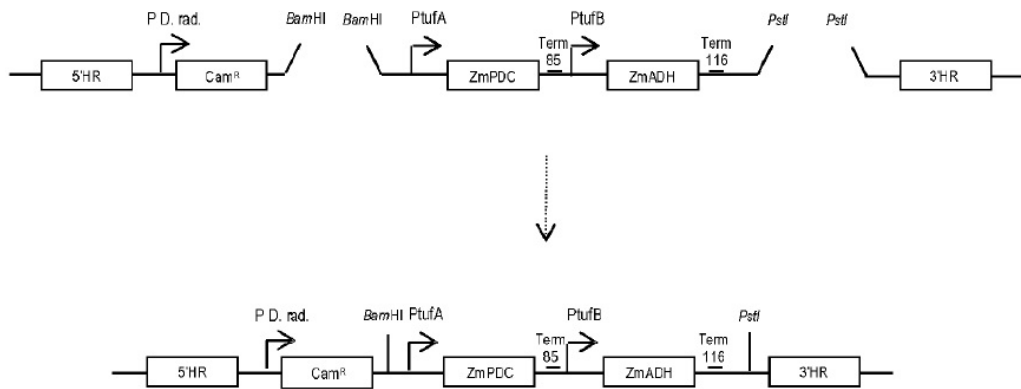


Figura 8