

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 422**

51 Int. Cl.:

C12P 7/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2012 PCT/EP2012/073242**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13076144**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2012 E 12790547 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2783007**

54 Título: **Cepas de microorganismo para la producción de 2,3-butanodiol**

30 Prioridad:

21.11.2011 EP 11190018

21.11.2011 US 201161562136 P

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

13.12.2017

73 Titular/es:

METABOLIC EXPLORER (100.0%)

Biopole Clermont-Limage

63360 Saint Beuzire, FR

72 Inventor/es:

DISCHERT, WANDA;

LETELLIER, GUILLAUME;

FIGGE, RAINER y

DOUCHIN, VÉRONIQUE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 646 422 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

Cepas de microorganismo para la producción de 2,3-butanodiol.

5 **Campo técnico de la invención**

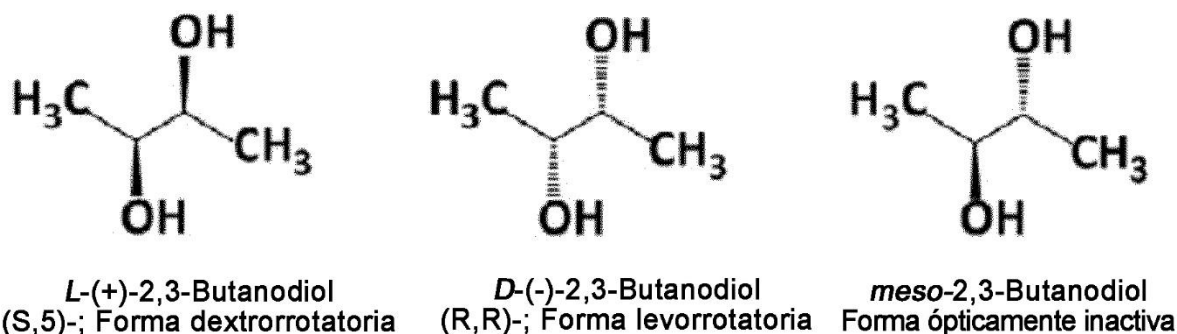
La presente exposición proporciona un microorganismo no natural que presenta una ruta de 2,3-butanodiol. El microorganismo recombinante es modificado para mejorar la producción de 2,3-butanodiol en comparación con el microorganismo no modificado. La exposición proporciona además procedimientos para utilizar dichos microorganismos para producir 2,3-butanodiol.

Antecedentes de la invención

Con el progresivo agotamiento de las reservas de petróleo, los sistemas de biorrefinería que integran procedimientos y equipos de conversión de biomasa para producir combustibles, energía y productos químicos a partir de recursos anualmente renovables se encuentran en etapa de desarrollo en todo el mundo. Muchos productos químicos que anteriormente sólo podían producirse mediante procedimientos químicos tradicionales actualmente presentan el potencial de ser generados biológicamente, utilizando recursos renovables (Danner y Braun, 1999; Hatti-Kaul et al., 2007). La producción microbiana de 2,3-butanodiol (2,3-BDO) es un ejemplo de ello. El interés en este bioprocedimiento se ha incrementado notablemente debido a que el 2,3-BDO presenta un gran número de aplicaciones industriales, y la producción microbiana aliviará la dependencia del suministro de petróleo para la producción de productos químicos de plataforma (Celińska y Grajek, 2009; Wu et al., 2008).

El 2,3-BDO también es conocido como 2,3-butilenglicol, dimetilenglicol, dimetiletilenglicol y el nombre IUPAC es butano-2,3-diol. Su forma molecular es $C_4H_{10}O_2$. El número de CAS es 513-85-9.

El 2,3-BDO existe en 3 formas isoméricas: D(-), L(+) y meso, tal como se muestra a continuación:



Una posible aplicación del 2,3-BDO es su conversión a 1,3-butadieno, que puede utilizarse en la producción sintética de caucho. Además, el 2,3-BDO presenta potenciales aplicaciones en la fabricación de tintas de impresión, perfumes, fumigantes, agentes humectantes y suavizantes, explosivos, plastificadores, alimentos y farmacéuticos (Garg y Jain, 1995; Syu, 2001).

La producción microbiana de 2,3-BDO presenta una historia de más de 100 años. Fue investigada por primera vez en 1906 por Harden y Walpole y en 1912 por Harden y Norris (Magee y Kosaric, 1985). La bacteria utilizada en estos primeros estudios era *Klebsiella pneumoniae* (anteriormente *Aerobacter aerogenes* o *Klebsiella aerogenes*). Desde entonces, la producción de 2,3-BDO ha progresado y se encuentra bien descrita en bacterias (Celińska y Grajek, 2009; Ji et al., 2011), principalmente las bacterias de grupo de riesgo 2 y de grupo de riesgo 1, incluyendo *E. coli* (Ui et al., 2004; Nielsen et al., 2010).

El 2,3-butanodiol es un producto secundario de la fermentación alcohólica por levaduras y habitualmente uno de los constituyentes menores más abundantes del vino. Se origina a partir de la reducción de la acetoína (Romano y Suzzi, 1996). Se han realizado numerosos intentos de manipular las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con rendimientos reducidos de acetoína, mediante la reorientación de los carbonos hacia el glicerol y el 2,3-BDO, con el fin de obtener levaduras de bajo contenido de alcohol con características organolépticas deseables, permitiendo la reducción del contenido de etanol en vinos de hasta 3° (Ehsani et al., 2009; González et al., 2010).

Las células de levadura más recientemente han sido consideradas un mini-biorreactor celular para producir 2,3-BDO. Por ejemplo, la solicitud de patente nº WO2011041426 proporciona células de levadura que son manipuladas para que presenten un crecimiento y producción incrementados de productos, entre ellos el 2,3-BDO. En particular, en dichas células de levadura, se han inactivado uno o más genes de la piruvato descarboxilasa con el fin de suprimir la ruta metabólica endógena competidora en la utilización del piruvato. Ehsani et al. (2009) proporciona un ejemplo de producción de 2,3-BDO en *S. cerevisiae* que sobreexpresa

butanol deshidrogenasa (BDH) con una conversión inicial de piruvato en acetaldehído, que seguidamente es convertido en acetoína. Se describen otros ejemplos de producción de 2,3-BDO en la solicitud de patente nº WO2010151525 y en la publicación de Ng et al. (2012).

5 Generalmente, las levaduras pueden crecer con rapidez y pueden cultivarse a una densidad más alta que las bacterias y no requieren un medio aséptico en el contexto industrial. Además, las células de levadura pueden separarse más fácilmente del medio de cultivo que las células bacterianas, simplificando en gran medida el procedimiento de extracción y purificación del producto.

10 Los presentes inventores proponen rutas alternativas para mejorar la biosíntesis del 2,3-butanodiol en los microorganismos, incluyendo levaduras y bacterias, con respecto al impacto medioambiental, rendimiento de producción, facilidad de recuperación o economía.

15 La presente exposición se refiere a nuevas rutas alternativas para la producción fermentativa de 2,3-butanodiol y proporciona un microorganismo no natural que presenta una ruta de 2,3-butanodiol.

20 En particular, la exposición se refiere a un microorganismo recombinante manipulado para producir 2,3-butanodiol (BDO), en el que dicho microorganismo es seleccionado entre bacteria y levadura y que sobreexpresa por lo menos un gen codificante de un polipéptido participante en la conversión del piruvato en 2,3-butanodiol. Según la invención, el 2,3-butanodiol puede obtenerse mediante seis rutas metabólicas diferentes.

La primera ruta de la exposición comprende genes codificantes de polipéptidos con actividad de acetolactato sintasa (ALS), acetolactato descarboxilasa (ALDC) y butanodiol deshidrogenasa (BDH).

25 La segunda ruta de la exposición implica genes codificantes de un polipéptido que cataliza la conversión del piruvato en acetaldehído; polipéptidos que catalizan la conversión del piruvato en acetil-CoA y la conversión del acetil-CoA en acetaldehído, un polipéptido que cataliza la condensación del piruvato y/o el acetaldehído en acetoína y un polipéptido que presenta actividad de butanodiol deshidrogenasa (BDH), reduciendo de esta manera la acetoína en 2,3-butanodiol.

30 La tercera ruta de la exposición comprende genes codificantes de polipéptidos con actividad de acetolactato sintasa (ALS) y butanodiol deshidrogenasa (BDH).

35 La cuarta ruta implica genes codificantes de polipéptidos que presentan actividad de piruvato descarboxilasa (PDC) y piruvato formato liasa (PFL), acetoína deshidrogenasa (ACDH) y butanodiol deshidrogenasa (BDH).

La quinta ruta de la exposición comprende genes codificantes de polipéptidos con actividad de propionato CoA transferasa, beta-ceto-tiolasa, tioesterasa, beta-ceto-ácido descarboxilasa y butanodiol deshidrogenasa (BDH).

40 La sexta ruta de la exposición implica genes codificantes de polipéptidos que presentan actividad de acetolactato sintasa (ALS), 3-hidroxi alcanato descarboxilasa, deshidratasa, acetolactato descarboxilasa y butanodiol deshidrogenasa (BDH).

45 En otro aspecto, la exposición se refiere a un procedimiento de producción de 2,3-butanodiol que comprende proporcionar un microorganismo recombinante, cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono y recuperar el 2,3-butanodiol.

Sumario de la invención

50 La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 5.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 representa la primera ruta metabólica del 2,3-butanodiol, denominada Ruta 1.

La figura 2 representa la segunda ruta metabólica del 2,3-butanodiol, denominada Ruta 2.

La figura 3 representa la tercera ruta metabólica del 2,3-butanodiol, denominada Ruta 3.

60 La figura 4 representa la cuarta ruta metabólica del 2,3-butanodiol, denominada Ruta 4.

La figura 5 representa la quinta ruta metabólica del 2,3-butanodiol, denominada Ruta 5.

La figura 6 representa la sexta ruta metabólica del 2,3-butanodiol, denominada Ruta 6.

65

Descripción detallada de la invención

Antes de describir la presente invención en detalle, debe apreciarse que la presente invención no se encuentra limitada a procedimientos particularmente ejemplificados y puede, evidentemente, variar. También debe apreciarse que la terminología utilizada en la presente memoria está destinada a describir formas de realización particulares de la invención únicamente y no pretende ser limitativa, y se encontrará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en la presente memoria, anterior o posteriormente, se incorporan como referencia en la presente memoria en su totalidad. Sin embargo, las publicaciones mencionadas en la presente memoria se citan con el fin de describir y dar a conocer los protocolos, reactivos y vectores que se informan en las publicaciones y que podrían utilizarse relacionados con la invención.

Además, la práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de microbiología y biología molecular comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas son bien conocidas por el experto y se explican en mayor detalle en la literatura. Ver, por ejemplo, Guthrie y Fink, 2004, y Sambrook et al., 1999, 2001.

Debe indicarse que tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" o "una" y "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un microorganismo" incluye una pluralidad de dichos microorganismos, y la referencia a "un gen endógeno" es una referencia a uno o más genes endógenos, etc. A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse cualesquiera materiales y procedimientos similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria para la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen los materiales y procedimientos preferentes.

En las reivindicaciones, posteriormente, y en la descripción anterior de la invención, excepto en donde el contexto indica lo contrario expresado explícitamente o como implicación necesaria, los términos "comprende", "presenta", "contiene" o "incluye" o variaciones tales como "comprendiendo", "que comprende", "incluyendo", "que incluye", "presentando", "que presenta", "conteniendo" o "que contiene" se utilizan en un sentido inclusivo, es decir, para especifica la presencia de las características indicadas pero sin excluir la presencia o la adición de características adicionales en diversas formas de realización de la invención.

Definiciones

Los términos 2,3-butanodiol, 2,3-BDO o BDO se utilizan intercambiamente en la invención y se refieren a butano-2,3-diol, también denominado dimetilenglicol.

El término "microorganismo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una bacteria, levadura u hongo que no ha sido modificado artificialmente. El microorganismo puede ser "donante" en el caso de que proporcione un elemento genético que debe integrarse en el microorganismo "aceptor" que expresará dicho elemento genético foráneo o en el caso de que se utilice como herramienta para construcciones genéticas o expresiones de proteínas.

El microorganismo de la invención se selecciona de entre bacteria, levadura u hongo que expresa genes para la biosíntesis de 2,3-butanodiol.

Preferentemente, la bacteria de la invención se selecciona de entre *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomyetaceae* y *Corynebacteriaceae*. Más preferentemente, el microorganismo es una especie de *Escherichia*, *Pantoea*, *Salmonella* o *Corynebacterium*. Todavía más preferentemente, el microorganismo es la especie *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum*.

Preferentemente, la levadura de la invención se selecciona de entre los géneros *Saccharomycetaceae*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Ashbya*, *Dekkera*, *Pichia* (*Hansenula*), *Debaryomyces*, *Clavispora*, *Lodderomyces*, *Yarrowia*, *Schizosaccharomyces*, *Cryptococcus* y *Malassezia*. Más preferentemente, la levadura es una especie de *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces* o *Yarrowia*. Según un aspecto específico de la invención, la levadura es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* o *Kluyveromyces marxianus*.

Más preferentemente, la bacteria es *Escherichia coli* y la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

La expresión "microorganismo recombinante" o "microorganismo genéticamente modificado" o "levadura recombinante" o "levadura genéticamente modificada" o "bacteria recombinante" o "bacteria genéticamente modificada", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un microorganismo, incluyendo levaduras y

bacterias, modificado genéticamente o manipulado genéticamente. Se refiere, según el significado habitual de dichas expresiones, a que el microorganismo de la invención no se encuentra en la naturaleza y ha sido modificado mediante la introducción o mediante la delección o mediante la modificación de elementos genéticos de un microorganismo equivalente que se encuentra en la naturaleza. También puede transformarse mediante forzado del desarrollo y evolución de nuevas rutas metabólicas mediante la combinación de mutagénesis dirigida y evolución bajo una presión de selección específica (ver, por ejemplo, el documento WO2004076659).

Un microorganismo puede ser modificado para expresar genes exógenos en el caso de que dichos genes se introduzcan en el microorganismo con todos los elementos que permiten su expresión en el microorganismo huésped. Un microorganismo puede ser modificado para modular el nivel de expresión de un gen endógeno. La modificación o "transformación" de un microorganismo como una bacteria o levadura con ADN exógeno es una tarea rutinaria para el experto en la materia.

La expresión "gen endógeno" se refiere a que el gen se encontraba presente en el microorganismo antes de cualquier modificación genética, en la cepa de tipo salvaje. Los genes endógenos pueden sobreexpresarse mediante la introducción de secuencias heterólogas adicionalmente a, o en sustitución de, elementos reguladores endógenos, o mediante la introducción de una o más copias adicionales del gen en el cromosoma o en un plásmido. Los genes endógenos también pueden modificarse para modular su expresión y/o actividad. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones en la secuencia codificante para modificar el producto génico o pueden introducirse secuencias heterólogas adicionalmente a, o en sustitución de, elementos reguladores endógenos. La modulación de un gen endógeno puede resultar en la regulación positiva y/o potenciación de la actividad del producto génico, o alternativamente, en la regulación negativa y/o atenuación de la actividad del producto del gen endógeno. Otro modo de potenciar la expresión de genes endógenos es la introducción de una o más copias adicionales del gen en el cromosoma o en un plásmido.

La expresión "gen exógeno" se refiere a que el gen se introdujo en un microorganismo por medios bien conocidos por el experto en la materia, mientras que este gen no se encuentra presente naturalmente en el microorganismo. Los genes exógenos pueden ser heterólogos o no. El microorganismo puede expresar genes exógenos en el caso de que estos genes se introduzcan en el microorganismo con todos los elementos que permitan su expresión en el microorganismo huésped. La transformación de microorganismos con ADN exógeno es una tarea rutinaria para el experto en la materia. Los genes exógenos pueden integrarse en el cromosoma huésped o pueden expresarse extracromosómicamente a partir de plásmidos o vectores. Es bien conocida de la técnica una diversidad de plásmidos, que difieren con respecto a su origen de replicación y su número de copia en la célula. Estos genes pueden ser heterólogos u homólogos. La secuencia de los genes exógenos puede adaptarse para su expresión en el microorganismo huésped. En efecto, el experto en la materia posee la noción de sesgo en el uso de los codones y conocerá cómo adaptar las secuencias de ácidos nucleicos a un sesgo particular en el uso de los codones sin que se modifique la proteína deducida.

La expresión "gen heterólogo" se refiere a que el gen se deriva de una especie de microorganismo diferente del microorganismo receptor que lo expresa. Se refiere a un gen que no se encuentra presente naturalmente en el microorganismo.

En la presente solicitud, se hace referencia a todos los genes por sus nombres comunes y utilizando referencias que proporcionan acceso a sus secuencias de nucleótidos en los sitios de Internet <http://www.ebi.ac.uk/embl/> o <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Mediante la utilización de las referencias proporcionadas en GenBank de genes conocidos, el experto en la materia podrá determinar los genes equivalentes en otros organismos, cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo rutinario se lleva a cabo ventajosamente utilizando secuencias de consenso que pueden determinarse realizando alineaciones de secuencias con genes derivados de otros microorganismos y diseñando sondas degeneradas para clonar el gen correspondiente en otro organismo.

El experto en la materia conocerá diferentes medios para modular, y en particular para regular positivamente, la expresión de genes endógenos. Por ejemplo, un modo de potenciar la expresión de genes endógenos es introducir una o más copias adicionales del gen en el cromosoma o en un plásmido.

Otro modo es sustituir el promotor endógeno de un gen por un promotor más fuerte. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos.

Los promotores homólogos que es conocido que permiten un nivel elevado de expresión en levaduras son los que expresan genes glucolíticos: ADH1, GPDH, TEF1, HXT7 truncado, PFK1, FBA1, PGK1 y TDH3, etc. Más preferentemente, el promotor de HXT7 truncado es utilizado en las levaduras de la invención. En levaduras, el constructo de expresión de ácidos nucleicos preferentemente comprende secuencias reguladoras, tales como secuencias de promotor y de terminador, que se ligan operablemente a la secuencia de ácidos nucleicos codificante del transportador vegetal de pentosas.

Son secuencias de promotor preferentes, HXT7, HXT7 truncado, PFK1, FBA1, PGK1, ADH1 y TDH3. Son

secuencias de terminador preferentes, CYC1, FBA1, PGK1, PFK1, ADH1 y TDH3. El constructo de expresión de ácidos nucleicos puede comprender además secuencias de reconocimiento 5' y/o 3' y/o marcadores de selección.

5 Se encuentra perfectamente comprendido dentro de los conocimientos del experto en la materia la selección de promotores apropiados, por ejemplo son ampliamente utilizados los promotores de la colección que comprende 11 mutantes del promotor constitutivo fuerte TEF1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Nevoigt et al., 2007).

10 Los promotores homólogos que es conocido que permiten un nivel elevado de expresión en bacterias son, por ejemplo, los promotores *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{lac}* o el promotor lambda *cl*, que son ampliamente utilizados. Estos promotores pueden ser "inducibles" por un compuesto particular o una condición externa específica como la temperatura o la luz. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos.

15 El término "sobrexpresión" se refiere en el presente contexto a que la expresión de un gen o de un enzima se encuentra incrementado en comparación con el microorganismo no modificado. El incremento de la expresión de un enzima se obtiene mediante el incremento de la expresión de un gen codificante de dicho enzima.

20 La "actividad" de un enzima se utiliza intercambiamente con el término "función" y se refiere, en el contexto de la invención, a la reacción que es catalizada por el enzima.

25 Las expresiones "actividad reducida" o "actividad atenuada" de un enzima se refieren a una actividad catalítica específica reducida de la proteína obtenida mediante mutación en la secuencia de aminoácidos y/o concentraciones reducidas de la proteína en la célula obtenidas mediante mutación de la secuencia nucleótida o mediante delección del gen codificante.

La expresión "actividad incrementada" de un enzima se refiere a una actividad catalítica específica incrementada del enzima y/o a una cantidad/disponibilidad incrementada del enzima en la célula, obtenida mediante, por ejemplo, la sobreexpresión del gen codificante del enzima.

30 Las expresiones "que codifica" y "codificante" se refieren al procedimiento por el que un polinucleótido, mediante los mecanismos de transcripción y traducción, produce una secuencia de aminoácidos.

El gen o genes codificantes del enzima o enzimas pueden ser exógenos o endógenos.

35 El término "atenuación" referido a genes se refiere a que estos se expresan a una tasa inferior a la tasa no modificada. La atenuación puede conseguirse por medios y procedimientos conocidos por el experto en la materia y contiene la delección génica obtenida mediante recombinación homóloga, atenuación génica mediante inserción de un elemento externo en el gen o expresión génica bajo un promotor débil. El experto en la materia conocerá una diversidad de promotores que muestran diferentes fuerzas y qué promotor utilizar para una expresión genética débil.

40 Los procedimientos de la presente invención requieren la utilización de uno o más constructos de integración cromosómica para la introducción estable de una secuencia nucleótida heteróloga en una localización específica en el cromosoma o para la disrupción funcional de uno o más genes dianas en una célula microbiana modificada genéticamente. En algunas formas de realización, la disrupción del gen diana evita la expresión de una proteína funcional. En algunas formas de realización, la disrupción del gen diana resulta en la expresión de una proteína no funcional a partir del gen con disrupción.

45 Entre los parámetros de los constructos de integración cromosómica que pueden modificarse en la práctica de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las longitudes de las secuencias homólogas, la secuencia de nucleótidos de las secuencias homólogas, la longitud de la secuencia que se integra, la secuencia de nucleótidos de la secuencia que se integra y la secuencia de nucleótidos del locus diana. En algunas formas de realización, un intervalo eficaz para la longitud de cada secuencia homóloga es de 20 a 5.000 pares de bases, preferentemente de 40 pares de bases. En formas de realización particulares, la longitud de cada secuencia homóloga es de aproximadamente 500 pares de bases. Para más información sobre la longitud de homología requerida para el reconocimiento génico, ver Hasty et al., 1991. En algunas formas de realización, el vector de expresión o el vector de integración cromosómica utilizado para modificar genéticamente una célula microbiana de la invención comprende uno o más marcadores seleccionables útiles para la selección de células microbianas transformadas.

50 En algunas formas de realización, el marcador seleccionable es un marcador de resistencia antibiótica. Entre los ejemplos ilustrativos de marcadores de resistencia antibiótica se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, productos de los genes *BLA*, *NAT1*, *PAT*, *AUR1-C*, *PDR4*, *SMR1*, *CAT*, *dhfr* de ratón, *HPH*, *DSDA*, *KAN^R* y *SH BLE*. El producto del gen *BLA* de *E. coli* confiere resistencia a antibióticos beta-lactamo y a todas las penicilinas antibacterias Gram-negativas excepto la temocilina; el producto del gen *NAT1* de *S. noursei* confiere resistencia a la nourseotricina; el producto del gen *PAT* de *S. viridochromogenes* Tu94 confiere resistencia a Bialaphos; el

producto del gen *AUR1-C* de *Saccharomyces cerevisiae* confiere resistencia a la aureobasidina A (AbA); el producto del gen *PDR4* confiere resistencia a la cerulenina; el producto del gen *SMR1* confiere resistencia al sulfometuron metilo; el producto del gen *CAT* del transposón Tn9 confiere resistencia al cloranfenicol; el producto del gen *dhfr* de ratón confiere resistencia al metotrexato; el producto del gen *HPH* de *Klebsiella pneumonia* confiere resistencia a la higromicina B; el producto del gen *DSDA* de *E. coli* permite a las células crecer sobre placas con D-serina como única fuente de nitrógeno; el gen *KAN^R* del transposón Tn903 confiere resistencia a G418, y el producto del gen *SH BLE* de *Streptoalloteichus hindustanus* confiere resistencia a la zeocina (bleomicina). En algunas formas de realización, el marcador de resistencia a antibióticos se deleciona tras el aislamiento de la célula microbiana modificada genéticamente de la invención. El experto en la materia será capaz de seleccionar un marcador adecuado en el contexto genético específico.

En algunas formas de realización, el marcador seleccionable rescata una auxotrofia (por ejemplo una auxotrofia nutricional) en la célula microbiana modificada genéticamente. En dichas formas de realización, una célula microbiana parental comprende una disrupción funcional en uno o más productos génicos que funcionan en una ruta biosintética de aminoácidos o nucleótidos, tal como, por ejemplo, los productos de los genes *HIS3*, *LEU2*, *LYS1*, *LYS2*, *MET15*, *TRP1*, *ADE2* y *URA3* en la levadura, que convierte a la célula microbiana parental en incapaz de crecer en medios sin complementación con uno o más nutrientes (fenotipo auxotrófico). En este caso el fenotipo auxotrófico puede ser rescatado mediante la transformación de la célula microbiana parental con un vector de expresión o integración cromosómica codificante de una copia funcional del producto del gen interrumpido, y la célula microbiana modificada genéticamente que se genera puede seleccionarse basándose en la pérdida del fenotipo auxotrófico de la célula microbiana parental. La utilización de los genes *URA3*, *TRP1* e *HIS3* como marcadores seleccionables presenta una ventaja notable debido a que son posibles selecciones tanto positivas como negativas. La selección positiva se lleva a cabo mediante complementación auxotrófica de las mutaciones de *URA3*, *TRP1* y *LYS2*, mientras que la selección negativa se basa en inhibidores específicos, es decir, ácido 5-fluoro-orótico (FOA), ácido 5-fluoroantranílico y ácido α -aminoadípico (aAA), respectivamente, que evitan el crecimiento de las cepas prototróficas pero permite el crecimiento de los mutantes *URA3*, *TRP1* e *HIS3*, respectivamente. Preferentemente, el gen marcador seleccionable es *HIS3*.

Los promotores, terminadores transcripcionales y regiones codificantes adecuados pueden clonarse en vectores lanzadera de *E. coli*-levadura y transformarse en células de levadura tal como se indica en los Ejemplos. Estos vectores permiten la propagación en cepas tanto de *E. coli* como de levadura. El vector contiene un marcador seleccionable y secuencias que permiten la replicación autónoma, o la integración cromosómica en el huésped deseado. Los plásmidos utilizados en levaduras son, por ejemplo, los vectores lanzadera p423H7, p424H7, p425H7 y p426H7 (Wieczorke et al., 1999, y Hamacher et al., 2002) que contienen un origen de replicación de *E. coli*, un origen de replicación de levadura y un marcador para la selección nutricional. Los marcadores de selección para dichos cuatro vectores son *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*.

En otras formas de realización, el marcador seleccionable rescata otras deficiencias o fenotipos no letales que pueden identificarse mediante un procedimiento de selección conocido.

La "fermentación" o "cultivo" se lleva a cabo generalmente en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado al microorganismo bajo cultivo, que contiene por lo menos una fuente de carbono simple y, en caso necesario, cosustratos.

Los microorganismos dados a conocer en la presente memoria pueden cultivarse en medios de fermentación para la producción de un producto a partir de piruvato. Para la producción máxima de algunos productos, tales como el 2,3-butanodiol, las cepas de microorganismo utilizadas como huéspedes de producción preferentemente presentan una tolerancia incrementada al compuesto químico producido y presentan una tasa elevada de utilización de carbohidratos. Estas características pueden conferirse mediante mutagénesis y selección, ingeniería genética o pueden ser naturales.

Los medios de fermentación o "medio de cultivo" para las presentes células contienen por lo menos aproximadamente 2 g/l de glucosa. Entre los sustratos de carbono adicionales pueden incluirse, aunque sin limitación, monosacáridos, tales como fructosa, manosa, xilosa y arabinosa, oligosacáridos, tales como lactosa, maltosa, galactosa o sacarosa; polisacáridos, tales como almidón o celulosa o mezclas de los mismos y mezclas no purificadas de materias primas renovables, tales como permeado de suero de queso, licor de maceración del maíz, melaza de remolacha azucarera y malta de cebada. Entre otros sustratos de carbono pueden incluirse etanol, lactato, succinato o glicerol. Por lo tanto, se encuentra contemplado que la fuente de carbono utilizada en la presente invención puede comprender una amplia diversidad de sustratos que contienen carbono y sólo se encontrará limitada por la elección de organismo. En una forma de realización específica de la invención, el sustrato puede ser un hidrolizado de fuentes de carbono de segunda generación, tales como paja de trigo, plantas de *Miscanthus*, bagazo de la caña azucarera, madera y otros que son conocidos por el experto en la materia.

Aunque se encuentra contemplado que la totalidad de los sustratos de carbono anteriormente indicados y mezclas de los mismos resulten adecuados en la presente invención, los sustratos de carbono preferentes son la

glucosa, la fructosa y la sacarosa, o mezclas de los mismos con azúcares C5, tales como la xilosa y/o la arabinosa para los microorganismos modificados para utilizar azúcares C5.

5 Además de una fuente de carbono apropiada, el medio de fermentación debe contener minerales, sales, cofactores, tampones y otros componentes adecuados, conocidos por el experto en la materia, adecuados para el crecimiento de los cultivos y la estimulación de la ruta enzimática necesaria para la producción del producto deseado.

10 La expresión "condiciones anaeróbicas" se refiere a condiciones bajo las que la concentración de oxígeno en el medio de cultivo es excesivamente baja para que la utilice el microorganismo como aceptor terminal de electrones. Las condiciones anaeróbicas pueden conseguirse mediante burbujeo del medio de cultivo con un gas inerte, tal como nitrógeno, hasta que el oxígeno ya no se encuentre disponible para el microorganismo, o mediante el consumo del oxígeno disponible por el microorganismo.

15 La expresión "condiciones aeróbicas" se refiere a concentraciones de oxígeno en el medio de cultivo que son suficientes para que un microorganismo aeróbico o anaeróbico facultativo lo utilice como aceptor terminal de electrones.

20 La expresión "condiciones microaeróbicas" se refiere a un medio de cultivo en el que la concentración de oxígeno es inferior a la que presenta en el aire, es decir, una concentración de oxígeno de hasta 6% de O₂.

25 Un "medio de cultivo apropiado" se refiere a un medio (por ejemplo un medio líquido estéril) que comprende nutrientes esenciales o beneficiosos para el mantenimiento y/o crecimiento de la célula, tales como fuentes de carbono o sustrato de carbonos, fuentes de nitrógeno, por ejemplo peptona, extractos de levadura, extractos de carne, extractos de malta, urea, sulfato amónico, cloruro amónico, nitrato amónico y fosfato amónico; fuentes de fósforo, por ejemplo fosfato monopotásico o fosfato dipotásico; elementos traza (por ejemplo sales metálicas), por ejemplo sales de magnesio, sales de cobalto y/o sales de manganeso, así como factores de crecimiento, tales como aminoácidos, vitaminas, promotores del crecimiento y similares.

30 La expresión "fuente de carbonos" o "sustrato de carbonos" según la presente invención se refiere a cualquier fuente de carbono que puede ser utilizada por el experto en la materia para prestar soporte al crecimiento normal de un microorganismo, incluyendo hexosas (tales como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, oligosacáridos, disacáridos (tal como sacarosa, celobiosa o maltosa), melazas, almidón o sus derivados, celulosa, hemicelulosas y combinaciones de los mismos.

35 Rutas de biosíntesis de 2,3-butanodiol

40 La presente exposición se refiere a un microorganismo recombinante manipulado para expresar una ruta de 2,3-butanodiol, mediante la sobreexpresión de por lo menos un gen codificante de un polipéptido que participa en la conversión del piruvato en 2,3-butanodiol.

Preferentemente, el microorganismo recombinante dado a conocer en la presente memoria sobreexpresa por lo menos un gen exógeno que participa en la biosíntesis de 2,3-butanodiol.

45 En un aspecto de la exposición, el microorganismo recombinante muestra una producción reducida de productos secundarios de 2,3-butanodiol.

50 En levaduras, el producto secundario principal del 2,3-butanodiol es el etanol. De esta manera, la actividad de por lo menos un enzima catalizador de la conversión del acetaldehído en etanol seleccionado de entre ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7 y SAF1 se encuentra reducida.

55 Es conocido que las levaduras producen etanol muy eficientemente durante la fermentación. El etanol es producido a partir de piruvato por un enzima con actividad de alcohol deshidrogenasa (ADH). En las levaduras se encuentran presentes ocho ADH diferentes: ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7 y SFA1, codificados por los genes *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7* y *SFA1*, respectivamente (Smidt et al., 2012). Con el fin de incrementar la productividad de 2,3-butanodiol resulta necesario reducir la producción de etanol.

60 Preferentemente, la célula de levadura recombinante muestra una actividad reducida de por lo menos un enzima catalizador de la conversión del acetaldehído en etanol seleccionado de entre ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7 y SFA1.

65 En particular, se encuentra reducida la actividad de ADH1. Por ejemplo, las actividades de ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5 y SFA1 se encuentran reducidas en la célula de levadura recombinante. Más preferentemente, las actividades de ADH1, ADH3 y ADH5 se encuentran reducidas en la célula de levadura recombinante. Preferentemente, las actividades de ADH se reducen mediante la atenuación de la expresión de los genes

codificantes correspondientes. En particular, según la exposición, el gen *ADH1* se deleciona en la célula de levadura recombinante. Más preferentemente, se encuentran delecionados los genes *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5* y *SFA1*. Todavía más preferentemente, se encuentran delecionados los genes *ADH1*, *ADH3* y *ADH5*.

5 En bacterias, los productos secundarios principales del 2,3-butanodiol son el lactato y el acetato. De esta manera, se encuentra reducida la actividad de por lo menos un enzima catalizador de la conversión del piruvato en lactato o acetato. Preferentemente, se encuentra reducida la actividad de por lo menos un enzima seleccionado de entre *LdhA*, *PoxB*, *AckA*, *Pta* o *AceEF*. Más preferentemente, se encuentran reducidas las actividades de la totalidad de *LdhA*, *PoxB*, *AckA* y *Pta*.

10 Preferentemente, dichas actividades se reducen mediante la atenuación de la expresión de los genes codificantes correspondientes. En particular, se atenúa la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre *ldhA*, *poxB*, *ackA*, *pta* o *aceEF*. Más particularmente, se deleciona la totalidad de los genes *ldhA*, *poxB*, *ackA* y *pta*.

15 Según la exposición, el 2,3-butanodiol es producido en un microorganismo recombinante mediante seis rutas metabólicas diferentes, que se describen a continuación.

20 Ruta 1

La primera ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol (figura 1) incluye las etapas sucesivas siguientes: a) conversión del piruvato en acetolactato mediante la acetolactato sintasa (ALS), (b) conversión del acetolactato en acetoína por la acetolactato descarboxilasa (ALDC) y c) conversión de la acetoína en 2,3-butanodiol por la butanodiol deshidrogenasa (BDH).

25 En un aspecto de la exposición, el microorganismo recombinante expresa genes codificantes de polipéptidos con una actividad de acetolactato sintasa (ALS), acetolactato descarboxilasa (ALDC) y butanodiol deshidrogenasa (BDH).

30 Los diferentes genes son genes endógenos o genes exógenos. El experto en la materia conocerá que en el presente microorganismo recombinante puede utilizarse un polipéptido con actividad de ALS, ALDC o BDH aislado a partir de una diversidad de organismos. El experto en la materia conocerá cómo identificar secuencias de nucleótidos o aminoácidos similares utilizando algoritmos bioinformáticos tales como BLAST (Altschul et al., 1993) en bases de datos disponibles públicamente con secuencias conocidas.

35 Los enzimas ALS, que también pueden denominarse ácido acetohidroxi sintasas y pertenecen a la clase de enzimas 2.2.1.6 son bien conocidos por el experto en la materia ya que participan en la ruta biosintética de los aminoácidos proteinogénicos leucina y valina y en la producción fermentativa de 2,3-butanodiol en muchos organismos.

40 En la presente exposición, los enzimas ALS que presentan especificidad de sustrato para el piruvato frente al cetopiruvato resultan preferentes.

45 Los enzimas que presentan actividad de ALS están codificados por uno de los genes siguientes: *ilvB* e *ilvN* de *Corynebacterium glutamicum*, *ilvB* y *ilvN* de *E. coli*, *budB* y *alsS* de *Klebsiella pneumoniae* 342, *budB* de *Klebsiella oxytoca*, *budB* de *Enterobacter aerogenes*, *slaB* de *Serratia marcescens*, *ILV2* e *ILV6* de *Saccharomyces cerevisiae*, *alsS* de *Bacillus subtilis subtilis* 168, *alsS* de *Bacillus thuriengensis* o *PPSC2_c1472* de *Bacillus polymyxa*. Puede utilizarse cualquier gen codificante de ALS con una identidad de secuencia de por lo menos 80% a 85%, preferentemente de 85% a 90%, más preferentemente de 90% a 95%, todavía más preferentemente de 96%, 97%, 98% o 99% respecto a cualquiera de dichos genes.

50 Por ejemplo, el enzima ALS expresado se encuentra codificado por el gen *budB* de *Klebsiella pneumoniae*.

55 En otro ejemplo, el enzima ALS expresado se encuentra codificado por los genes *ILV2* o *ILV6* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Más preferentemente, en la bacteria dada a conocer en la presente memoria, el enzima ALS se encuentra codificado por el gen *budB* de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que en la levadura de la exposición, el enzima ALS se encuentra codificado por el gen *ILV2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

60 Con el fin de optimizar la biosíntesis del 2,3-butanodiol en la levadura, la ALS se expresa específicamente en el citosol. Esta expresión citosólica se consigue mediante la transformación de la levadura con un gen codificante de una ALS que no presenta la secuencia de señal de direccionamiento mitocondrial tal como se indica en Brat et al., 2012.

65

Los enzimas ALDC pertenecientes a la clase de enzimas 4.1.1.15 y que se encuentran naturalmente ausentes de las levaduras se encuentran codificados por los genes *budA* de *Klebsiella pneumoniae*, *budA* de *Klebsiella oxytoca*, *budA* de *Enterobacter aerogenes*, *salA* de *Serratia marcescens*, *alsD* de *Bacillus subtilis subtilis* 168, *alsD* de *Bacillus thuriengensis* o *PPSC2_c2281* de *Bacillus polymyxa*. Puede utilizarse cualquier gen codificante de ALDC con una identidad de secuencia de por lo menos 80% a 95%, preferentemente de 85% a 90%, más preferentemente de 90% a 95%, todavía más preferentemente de 96%, 97%, 98% o 99% respecto a cualquiera de dichos genes.

Por ejemplo, el enzima ALDC expresado se encuentra codificado por el gen *budA* de *Klebsiella pneumoniae* en la bacteria y la levadura dadas a conocer en la presente memoria.

Los enzimas BDH también pueden denominarse acetoína reductasa. Los enzimas BDH pueden presentar especificidad para la producción de (R)-2,3-butanodiol (EC 1.1.1.4) o (S)-2,3-butanodiol (EC 1.1.1.76). En el caso de que resulte preferente una de las dos formas, el experto en la materia conocerá qué enzima seleccionar y producir en exceso en la célula recombinante para estimular la producción específica.

Los enzimas con actividad de BDH se encuentran codificados en particular por uno de los genes siguientes: *butA* de *Corynebacterium glutamicum*, *budC* de *Klebsiella pneumoniae*, *budC* de *Klebsiella oxytoca*, *EAE_17490* de *Enterobacter aerogenes*, *slaC* de *Serratia marcescens*, *BDH1* y *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*, *bdhA* de *Bacillus subtilis subtilis* 168, *BMB171_C0587* de *Bacillus thuriengensis* o *PPSC2_c3335* y *PPSC2_c3890* de *Bacillus polymyxa*. Puede utilizarse cualquier gen codificante de BDH que presente una identidad de secuencia de por lo menos 80% a 85%, preferentemente de 85% a 90%, más preferentemente de 90% a 95%, todavía más preferentemente de 96%, 97%, 98%, 99% respecto a cualquiera de dichos genes.

Por ejemplo, el enzima BDH expresado se encuentra codificado por el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*.

A título de otro ejemplo, el enzima BDH expresado se encuentra codificado por los genes *BDH1* y *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Más preferentemente, en la bacteria dada a conocer en la presente memoria, el enzima BDH se encuentra codificado por el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que en la levadura dada a conocer en la presente memoria, el enzima BDH se encuentra codificado por el gen *BDH1* de *Saccharomyces cerevisiae* o *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Por ejemplo, la bacteria recombinante dada a conocer en la presente memoria expresa los genes *budB*, *budA* y *budC* de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que los genes endógenos codificantes de ALS, ALDC y BDH han sido deletados.

En otro ejemplo, la levadura recombinante dada a conocer en la presente memoria expresa el gen *budA* de *Klebsiella pneumoniae*, y los genes *ILV2* y *BDH1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Preferentemente, la célula de levadura recombinante muestra una actividad reducida de por lo menos un enzima catalizador de la conversión de piruvato en acetaldehído de manera que mejora la conversión del piruvato en acetolactato. Preferentemente, la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre *PDC1*, *PDC5* o *PDC6* se encuentra atenuada en la levadura de la exposición. Más preferentemente, el gen *PDC1* ha sido deletado. Más preferentemente, los genes *PDC1*, *PDC5* y *PDC6* han sido deletados en la levadura modificada.

Ruta 2

La segunda ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol (figura 2) incluye las etapas sucesivas de conversión del piruvato en acetaldehído y/o acetil-CoA, la conversión del acetil-CoA en acetaldehído, la conversión del piruvato y/o acetaldehído en acetoína y la conversión de la acetoína en 2,3-butanodiol por la butanodiol deshidrogenasa (BDH).

En el presente aspecto de la exposición, la expresión "conversión del piruvato y/o el acetaldehído en acetoína" se refiere a la conversión de una molécula de piruvato y una molécula de acetaldehído en acetoína, o a la condensación de dos moléculas de acetaldehído en acetoína.

El microorganismo recombinante expresa los enzimas siguientes:

a) un polipéptido catalizador de la conversión del piruvato en acetaldehído o dos polipéptidos, uno catalizador de la conversión de piruvato en acetil-CoA y el otro catalizador de la conversión de acetil-CoA en acetaldehído, y

b) un polipéptido catalizador de la condensación del piruvato y el acetaldehído en acetoína o un polipéptido catalizador de la condensación del acetaldehído en acetoína, y

c) una butanodiol deshidrogenasa.

En un aspecto, el microorganismo recombinante expresa genes codificantes de polipéptidos que presentan actividad de conversión del piruvato en acetaldehído, de conversión de piruvato y/o acetaldehído en acetoína y de butanodiol deshidrogenasa (BDH).

La conversión del piruvato en acetaldehído y del piruvato y/o acetaldehído en acetoína puede llevarse a cabo con el mismo enzima: la piruvato descarboxilasa (PDC). El enzima PDC muestra varias actividades: la actividad principal es la conversión del piruvato en acetaldehído y su actividad secundaria es la conversión del piruvato y/o el acetaldehído en acetoína. La actividad secundaria de la PDC permite la conversión del piruvato y el acetaldehído en acetoína o la condensación de dos acetaldehídos en acetoína (Romano y Suzzi, 1996). Esta segunda actividad se denomina "acetoína sintasa".

Por ejemplo, se sobreexpresa por lo menos uno de los genes *PDC1*, *PDC5* y *PDC6* de *Saccharomyces cerevisiae* en la bacteria recombinante dada a conocer en la presente memoria. Más preferentemente, *PDC1* de *Saccharomyces cerevisiae* se sobreexpresa en la bacteria recombinante.

En otro ejemplo, el enzima PDC puede evolucionarse para potenciar su actividad de acetoína sintasa. Los enzimas evolucionados se criban para su rendimiento de conversión de piruvato y/o acetaldehído en acetoína. Una PDC evolucionada preferente es una PDC que muestra una actividad mejorada de acetoína sintasa de por lo menos 20% en comparación con la PDC no desarrollada. Se dan a conocer varios mutantes de PDC en Liu et al. (2011). Preferentemente, se utiliza la PDC mutante Glu477Gln.

En otro ejemplo, los enzimas PDC pueden evolucionarse para reducir su actividad de piruvato descarboxilasa, manteniendo simultáneamente su actividad de acetoína sintasa constante o incrementando su actividad de acetoína sintasa. En un ejemplo adicional, la proporción entre la actividad de acetoína sintasa y de piruvato descarboxilasa necesita mejorarse en un factor de por lo menos dos, preferentemente en un factor de diez y más preferentemente en un factor de 100, incrementando simultáneamente la actividad de acetoína sintasa del enzima.

En otro ejemplo, la actividad de acetoína sintasa de PDC se sustituye por un enzima glioxilato carboxi-liasa evolucionado (EC 4.4.1.47) o un nuevo enzima que muestra la misma actividad de conversión de piruvato y/o acetaldehído en acetoína. Los enzimas evolucionados se obtienen mediante evolución de un enzima que presenta actividad de carboxi-liasa y se criban según su especificidad para su sustrato. Por ejemplo, la glioxilato carboxi-liasa natural, codificada por el gen *gcl* de *Escherichia coli*, presenta especificidad de sustrato para el glioxilato, mientras que la glioxilato carboxi-liasa evolucionada presenta especificidad de sustrato para el piruvato y/o el acetaldehído.

En otro ejemplo, el acetaldehído puede obtenerse mediante conversión de acetil-CoA mediante la acetaldehído deshidrogenasa. La acetaldehído deshidrogenasa se encuentra codificada, por ejemplo, por el gen *mhpF* de *Escherichia coli* K12, el gen *dmpF* de *Pseudomonas* sp o *eutE* de *Salmonella enterica*, residiendo la actividad de acetaldehído deshidrogenasa en el extremo N-terminal de *adhE* de *E. coli*. Preferentemente, el microorganismo de la exposición sobreexpresa el gen *mhpF* de *E. coli*.

La acetil-CoA utilizada se obtiene a partir de piruvato mediante la actividad de piruvato formato liasa, que conduce a la producción de acetil-CoA y formato. En este contexto, el microorganismo recombinante sobreexpresará los genes *pflB* y/o *pflA* de *Escherichia coli* o cualquier otro enzima piruvato formato liasa conocido por el experto en la materia.

En un ejemplo adicional, el formato puede reciclarse en la célula mediante la sobreexpresión de complejos enzimáticos como FDH1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Van Den Berg y Steensma, 1997), FDH2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Overkamp et al., 2002), *fdh1* de *Candida boidinii* (Lu et al., 2009), complejo de formato hidrógeno liasa (FHL) de *Escherichia coli* (Sawers, 2005).

Tal como anteriormente, los enzimas con actividad de BDH se encuentran codificados por los genes *butA* de *Corynebacterium glutamicum*, *budC* de *Klebsiella pneumoniae* 342, *budC* de *Klebsiella oxytoca*, *EAE_17490* de *Enterobacter aerogenes*, *slaC* de *Serratia marcescens*, *BDH1* y *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*, *bdhA* de *Bacillus subtilis subtilis* 168, *BMB171_C0587* de *Bacillus thuriensis* o *PPSC2_c3335* y *PPSC2_c3890* de *Bacillus polymyxa*. Puede utilizarse cualquier gen codificante de BDH con una identidad de secuencia de por lo menos 80% a 85%, preferentemente de 85% a 90%, más preferentemente de 90% a 95%, todavía más preferentemente de 96%, 97%, 98% o 99% respecto a cualquiera de dichos genes.

Por ejemplo, el BDH utilizado se encuentra codificado por el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*.

Por ejemplo, el enzima BDH expresado se encuentra codificado por los genes *BDH1* y/o *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Más preferentemente, en la bacteria dada a conocer en la presente memoria, el enzima BDH se encuentra codificado por el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que en la levadura dada a conocer en la presente memoria, el enzima BDH se encuentra codificado por el gen *BDH1* o *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

5 Más específicamente, la presente invención se refiere a microorganismos que comprenden las modificaciones definidas en las reivindicaciones 1 a 4.

10 En las células de tipo salvaje, en anaerobiosis, la producción de poder reductor mediante catálisis de un sustrato resulta equilibrada por la síntesis de molécula reducidas, tales como el etanol o el acetato. En los presentes microorganismos recombinantes, las rutas de producción de etanol y acetato se encuentran interrumpidas, conduciendo a un estado redox no equilibrado. Puede utilizarse cualquier procedimiento que permita un incremento de la actividad enzimática dependiente de NADH en la presente célula huésped de producción para el equilibrado del redox. Por ejemplo, la adición de la piruvato formato liasa PFLAB en ausencia de oxígeno permite la utilización de uno o más NADH durante la conversión del acetyl-CoA en acetaldehído y consigue la producción de 2,3-BDO.

20 En un ejemplo particular, la bacteria recombinante dada a conocer en la presente memoria sobreexpresa el gen *PDC1* de *Saccharomyces cerevisiae*, los genes *pflB* y *mhpF* de *Escherichia coli*, y el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que los genes endógenos codificantes de ALS, ALDC y BDH y los genes *poxB*, *ldhA*, *ackA* y *pta* han sido deletados.

25 En otro ejemplo particular, la levadura recombinante dada a conocer en la presente memoria expresa el gen *PDC1* de *Saccharomyces cerevisiae* y sobreexpresa los genes *pflA*, *pflB* y *mhpF* de *Escherichia coli*, y el gen *BDH1* de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que los genes endógenos *ADH1*, *ADH3*, *ADH5* e *ILV2* de *Saccharomyces cerevisiae* han sido deletados.

Ruta 3

30 La tercera ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol (figura 3) incluye las etapas de conversión del piruvato en acetolactato por la acetolactato sintasa (ALS), la conversión del acetolactato en diacetilo, la conversión del diacetilo en acetoína y seguidamente de acetoína en 2,3-butanodiol por la butanodiol deshidrogenasa (BDH).

35 En un ejemplo, el microorganismo recombinante dado a conocer en la presente memoria expresa genes codificantes de polipéptidos que presentan actividad de acetolactato sintasa (ALS) y de butanodiol deshidrogenasa (BDH).

40 Tal como se ha observado anteriormente, los enzimas con actividad de ALS se encuentran codificados por los genes *ilvB* e *ilvN* de *Corynebacterium glutamicum*, *ilvB* e *ilvN* de *Escherichia coli*, *budB* y *alsS* de *Klebsiella pneumoniae* 342, *budB* de *Klebsiella oxytoca*, *budB* de *Enterobacter aerogenes*, *slaB* de *Serratia marcescens*, *ILV2* e *ILV6* de *Saccharomyces cerevisiae*, *alsS* de *Bacillus subtilis subtilis* 168, *alsS* de *Bacillus thuriengensis* o *PPSC2_c1472* de *Bacillus polymyxa*. Puede utilizarse cualquier gen codificante de ALS que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% a 85%, preferentemente de 85% a 90%, más preferentemente de 90% a 95%, todavía más preferentemente de 96%, 97%, 98% o 99% respecto a cualquiera de dichos genes.

45 Por ejemplo, el enzima ALS expresado se encuentra codificado por el gen *budB* de *Klebsiella pneumoniae*.

50 En otro ejemplo, el enzima ALS expresado se encuentra codificado por los genes *ILV2* e *ILV6* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Más preferentemente, en la bacteria dada a conocer en la presente memoria, el enzima ALS se encuentra codificado por el gen *budB* de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que en la levadura dada a conocer en la presente memoria, el enzima ALS se encuentra codificado por el gen *ILV2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

55 Con el fin de optimizar la biosíntesis de 2,3-butanodiol en la levadura, la ALS se expresa específicamente en el citosol. Esta expresión citosólica se consigue mediante la transformación de la levadura con un gen codificante de ALS que no presenta la secuencia de señal de direccionamiento mitocondrial, tal como se indica en Brat et al. (2012).

60 Los enzimas con actividad de BDH se encuentran codificados por los genes *butA* de *Corynebacterium glutamicum*, *budC* de *Klebsiella pneumoniae* 342, *budC* de *Klebsiella oxytoca*, *EAE_17490* de *Enterobacter aerogenes*, *slaC* de *Serratia marcescens*, *bdh1* y *bdh2* de *Saccharomyces cerevisiae*, *bdhA* de *Bacillus subtilis subtilis* 168, *BMB171_C0587* de *Bacillus thuriengensis* o *PPSC2_c3335* y *PPSC2_c3890* de *Bacillus polymyxa*. Puede utilizarse cualquier gen codificante de BDH con una identidad de secuencia de por lo menos 80% a 85%, preferentemente de 85% a 90%, más preferentemente de 90% a 95%, todavía más preferentemente de 96%, 97%, 98% o 99% respecto a cualquiera de dichos genes.

Por ejemplo, la BDH utilizada se encuentra codificada por el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*.

A título de ejemplo adicional, el enzima BDH expresado se encuentra codificado por los genes *BDH1* y/o *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Más preferentemente, en la bacteria dada a conocer en la presente memoria, el enzima BDH se encuentra codificado por el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que en la levadura dada a conocer en la presente memoria, el enzima BDH se encuentra codificado por el gen *BDH1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

En el microorganismo de tipo salvaje, la conversión de acetolactato en diacetilo se produce espontáneamente pero lentamente en presencia de oxígeno (Bassit et al., 1993).

Con el fin de mejorar dicha conversión, los genes codificantes de los enzimas catalizadores de dicha conversión, tales como *ILV6* de *S. cerevisiae* o *loxL2* de *Lactobacillus sakei*, son sobreexpresados en los microorganismos dados a conocer en la presente memoria. La lactato:oxígeno 2-oxidoreductasa codificada por el gen *loxL2* se evoluciona con el fin de obtener un enzima con actividad de conversión del acetolactato en diacetilo. Los enzimas evolucionados se criban para su especificidad de sustrato en acetolactato.

La ruta de producción del 2,3-butanodiol puede equilibrarse totalmente bajo condiciones anaeróbicas; sin embargo, para la producción de diacetilo resulta necesario el oxígeno. De esta manera, dicho problema puede resolverse mediante la inactivación de la cadena respiratoria para evitar la oxidación del NADH mediante respiración aeróbica y para garantizar una reducción completa del diacetilo en 2,3-butanodiol incluso en presencia de oxígeno.

Se ha demostrado que en *Escherichia coli* de tipo salvaje, puede obtenerse el fenotipo de fermentación en presencia de oxígeno mediante la delección de la citocromo oxidasa principal (citocromo bo, bd-I y bd-II) (Portnoy et al., 2010).

En un ejemplo, la citocromo C oxidasa de la levadura puede interrumpirse con el fin de obtener un fenotipo de fermentación a pesar de la presencia de oxígeno. Más exactamente, se desactiva uno o varios genes mitocondriales de entre COX1, COX2 y COX3. En combinación con otras modificaciones indicadas anteriormente, lo anterior estimulará la producción de 2,3-butanodiol mediante el diacetilo, permitiendo la ruta fermentativa única que se alcance el equilibrio redox.

En otro aspecto, la presente exposición se refiere a un procedimiento para producir 2,3-butanodiol que comprende las etapas siguientes: etapa 1) preparar una cepa modificada con la ruta 3 que produce acetolactato, el precursor del diacetilo mediante fermentación de la cepa; etapa 2) descarboxilación espontánea del acetolactato en presencia de oxígeno mediante la rotura de las células, para la producción del precursor diacetilo de la acetoina; etapa 3) producción de 2,3-butanodiol mediante un procedimiento de reacción enzimática con el precursor diacetilo como sustrato y el enzima conversor 2,3-butanodiol deshidrogenasa.

En la etapa 3, la reacción de bioconversión transforma el diacetilo recuperado de la etapa 2 en acetoina, que a su vez es convertida enzimáticamente en 2,3-butanodiol por el enzima BDH, que es producido en exceso en una cepa de microorganismo diferente que se cultiva por separado.

A título de ejemplo, la bacteria recombinante dada a conocer en la presente memoria expresa *alsS* y *budC* de *Klebsiella pneumoniae* y el gen *ILV6* de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que los genes endógenos codificantes de ALS, ALDC y BDH, y los genes *poxB*, *ldhA*, *ackA* y *pta* han sido delecionados. Además, en dicha bacteria recombinante, la expresión de los genes *aceE* y *aceF* se encuentra atenuada.

A título de ejemplo adicional, la levadura recombinante dada a conocer en la presente memoria expresa los genes *ILV2* y *BDH1* de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que los genes endógenos *ADH1*, *ADH3* y *ADH5* de *Saccharomyces cerevisiae* resultan delecionados.

Además, la célula de levadura recombinante muestra una actividad reducida de por lo menos un enzima catalizador de la conversión del piruvato en acetaldehído de manera que se mejora la conversión del piruvato en acetolactato. Preferentemente, por lo menos un gen seleccionado de entre *PDC1*, *PDC5* o *PDC6* resulta atenuado en la levadura dada a conocer en la presente memoria. Más preferentemente, el gen *PDC1* resulta delecionado. Más preferentemente, los genes *PDC1*, *PDC5* y *PDC6* resultan delecionados en la levadura modificada.

Ruta 4

La cuarta ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol (figura 4) incluye las etapas de a) conversión del piruvato en acetaldehído por la piruvato descarboxilasa (PDC) y a acetilCoA por la piruvato formato liasa (PFL), b)

condensación del acetaldehído y el acetyl-CoA en acetoína por una acetoína deshidrogenasa, y c) conversión de la acetoína en 2,3-butanodiol por la butanodiol deshidrogenasa (BDH).

El microorganismo recombinante expresa los enzimas siguientes:

- a) un polipéptido que cataliza la conversión del piruvato en acetaldehído y un polipéptido que cataliza la conversión del piruvato en acetyl-CoA, y
- b) un polipéptido que cataliza la condensación del acetyl-CoA y el acetaldehído en acetoína, y
- c) una butanodiol deshidrogenasa (BDH).

A título de ejemplo, el microorganismo recombinante dado a conocer en la presente memoria expresa genes codificantes de polipéptidos que presentan actividad de piruvato descarboxilasa (PDC), piruvato formato liasa (PFL), acetoína deshidrogenasa y butanodiol deshidrogenasa (BDH).

Tal como se ha indicado anteriormente, en la levadura los enzimas PDC se encuentran codificados por los genes PDC1, PDC5 y PDC6. A título de ejemplo, por lo menos uno de los genes *PDC1*, *PDC5* y *PDC6* de *Saccharomyces cerevisiae* se sobreexpresa en la bacteria recombinante dada a conocer en la presente memoria. Más preferentemente, en la bacteria recombinante se sobreexpresa *PDC1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

En otro ejemplo, la levadura recombinante sobreexpresa los genes *pflA* y/o *pflB* de *Escherichia coli*. Tal como en la ruta 2, el formato puede purificarse o desintegrarse.

Los enzimas con actividad de BDH se encuentran codificados por los genes *butA* de *Corynebacterium glutamicum*, *budC* de *Klebsiella pneumoniae* 342, *budC* de *Klebsiella oxytoca*, EAE_17490 de *Enterobacter aerogenes*, *slaC* de *Serratia marcescens*, *BDH1* y *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*, *bdhA* de *Bacillus subtilis* 168, BMB171_C0587 de *Bacillus thuriengensis* o PPSC2_c3335 y PPSC2_c3890 de *Bacillus polymyxa*. Puede utilizarse cualquier gen codificante de BDH con una identidad de secuencia de por lo menos 80% a 85%, preferentemente de 85% a 90%, más preferentemente de 90% a 95%, todavía más preferentemente de 96%, 97%, 98% o 99% respecto a cualquiera de dichos genes.

A título de ejemplo, la BDH utilizada se encuentra codificada por el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*.

En otro ejemplo, el enzima BDH expresado se encuentra codificado por los genes *BDH1* y *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Más preferentemente, en la bacteria dada a conocer en la presente memoria, el enzima BDH se encuentra codificado por el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que en la levadura dada a conocer en la presente memoria, el enzima BDH se encuentra codificado por el gen *BDH1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

La actividad de la acetoína deshidrogenasa se encuentra catalizada, por ejemplo, por las proteínas AcoA y ACoB codificadas por los genes *acoA* y *acoB* de *Bacillus subtilis*, ACoB codificado por el gen *acoB* de *Pseudomonas putida*, ButA codificado por el gen *butA* de *Streptococcus gordonii*, AcoA, AcoB y AcoC codificado por los genes *acoA*, *acoB* y *acoC* de *Pelobacter carbinolicus* o por AcoC codificado por el gen *acoC* de *Bacillus licheniformis*. Las diferentes proteínas o genes pueden modificarse con el fin de mejorar la actividad de condensación del acetaldehído y acetyl-CoA en acetoína. Preferentemente, *acoA* y *acoB* de *Bacillus subtilis* se sobreexpresan en el microorganismo dado a conocer en la presente memoria.

A título de ejemplo, la bacteria recombinante dada a conocer en la presente memoria sobreexpresa el gen *PDC1* de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen *pflB* de *Escherichia coli*, los genes *acoA* y *acoB* de *Bacillus subtilis* y el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que los genes endógenos codificantes de ALS, ALDC y BDH y los genes *poxB*, *ldhA*, *ackA* y *pta* han sido deletados.

En otro ejemplo, la levadura recombinante dada a conocer en la presente memoria expresa el gen *PDC1* de *Saccharomyces cerevisiae* y sobreexpresa los genes *pflA* y *pflB* de *Escherichia coli*, los genes *acoA* y *acoB* de *Bacillus subtilis* y el gen *BDH1* de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que los genes endógenos *ADH1*, *ADH3*, *ADH5* e *ILV2* de *Saccharomyces cerevisiae* han sido deletados.

Ruta 5

La quinta ruta de biosíntesis de 2,3-butanodiol (figura 5) incluye las etapas de conversión del lactato en lactoil-CoA por la propionato-CoA transferasa, la conversión del lactoil-CoA en 4-hidroxi-3-oxopentanoil-CoA por la beta-ceto-tiolasa, la conversión de 4-hidroxi-3-oxopentanoil-CoA en ácido 4-hidroxi-3-oxopentanoico por tioesterasa, la conversión del ácido 4-hidroxi-3-oxopentanoico en acetoína por la beta-ceto-ácido-decarboxilasa

y la conversión de la acetoina en 2,3-butanodiol por la butanodiol deshidrogenasa (BDH).

En la presente ruta, se obtiene lactato mediante la conversión del piruvato en lactato mediante la actividad de la lactato deshidrogenasa.

5 A título de ejemplo, el microorganismo recombinante dado a conocer en la presente memoria expresa genes codificantes de polipéptidos que presentan actividad de propionato-CoA transferasa, beta-ceto-tiolasa, tioesterasa, beta-ceto-ácido descarboxilasa y butanodiol deshidrogenasa (BDH).

10 Los enzimas con actividad de propionato-CoA transferasa son, por ejemplo, enzima codificado por el gen *pct* de *Listeria monocytogenes_F2365*, el gen *pct* de *Listeria welshimeri*, el gen *pct* de *Roseobacter denitrificans*, el gen *pct* de *Ralstonia eutropha*, el gen *pct* de *Rhizobium leguminosarum* o el gen *ydiF* de *Escherichia coli_APEC*.

15 Los enzimas con actividad de beta-ceto-tiolasa son, por ejemplo, el enzima codificado por el gen *paaJ* de *Escherichia coli*, el gen *pcaF* de *Pseudomonas knackmussii*, el gen *phaD* o *pcaF* de *Pseudomonas putida* o *paaE* de *Pseudomonas fluorescens*.

20 Los enzimas con actividad de tioesterasa son, por ejemplo, el enzima codificado por el gen *ACOT12* de *Bos taurus*, el gen *yneP* de *Bacillus subtilis*, el gen *ypch01226* de *Rhizobium etli*, el gen *hibch* de *Mus musculus* o el gen *hibch* de *Ratus norvegicus*.

Los enzimas con actividad de beta-ceto-ácido-decarboxilasa son, por ejemplo, el enzima codificado por el gen *kivD* de *Lactococcus lactis*, el gen *pdC* de *Clostridium acetobutylicum* o el gen *pdC2* de *Pichia stipitis*.

25 Los enzimas con actividad de BDH se encuentran codificados por los genes *butA* de *Corynebacterium glutamicum*, *budC* de *Klebsiella pneumoniae 342*, *budC* de *Klebsiella oxytoca*, *EAE_17490* de *Enterobacter aerogenes*, *slaC* de *Serratia marcescens*, *BDH1* y *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*, *bdhA* de *Bacillus subtilis subtilis 168*, *BMB171_C0587* de *Bacillus thuriengensis* o *PPSC2_c3335* y *PPSC2_c3890* de *Bacillus polymyxa*.

30 Puede utilizarse cualquier proteína codificante de un gen que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% a 85%, preferentemente de 85% a 90%, más preferentemente de 90% a 95%, todavía más preferentemente de 96%, 97%, 98% o 99% respecto a cualquiera de dichos genes.

Ruta 6

35 La sexta ruta de biosíntesis del 2,3-butanodiol (figura 6) incluye las etapas de condensación de piruvato y oxalacetato para producir ácido 2-acetil-2-hidroxi-butanodioico por la acetolactato sintasa (ALS), la conversión del ácido 2-acetil-2-hidroxi-butanodioico en ácido 2-metilidén-3-oxobutanoico por la 3-hidroxi-alcanoato-decarboxilasa, la conversión del ácido 2-metilidén-3-oxobutanoico en acetolactato por una deshidratasa, la conversión del acetolactato en acetoina por la acetolactato descarboxilasa (ALDC) y la conversión de acetoina en 2,3-butanodiol por la butanodiol deshidrogenasa (BDH).

45 A título de ejemplo, el microorganismo recombinante dado a conocer en la presente memoria expresa genes codificantes de polipéptidos con actividad de acetolactato sintasa (ALS), 3-hidroxi-alcanoato-decarboxilasa, deshidratasa, acetolactato descarboxilasa (ALDC) y butanodiol deshidrogenasa (BDH).

50 Los enzimas que presentan actividad de acetolactato sintasa (ALS) para la condensación del piruvato y oxalacetato para producir ácido 2-acetil-2-hidroxi-butanodioico son, por ejemplo, el enzima codificado por el gen *ilvB* de *Escherichia coli*, el gen *ilvH* de *Bacillus cereus*, el gen *ilvH* de *Corynebacterium glutamicum* y el gen *csr1* de *Arabidopsis thaliana*.

55 Los enzimas que presentan actividad de 3-hidroxi-alcanoato descarboxilasa son, por ejemplo, enzimas codificados por el gen *mvaD* de *Enterococcus faecalis*, el gen *yeaH* de *Lactococcus lactis*, el gen *NCU02127.1* de *Neurospora crassa* o el gen *MVD1* de *Schizosaccharomyces pombe*.

Los enzimas con actividad de deshidratasa para la conversión del ácido 2-metilidén-3-oxobutanoico en acetolactato son, por ejemplo, enzimas codificados por el gen *CSE45_3601* de *Citricella* sp. *SE45*, el gen *caiD* de *Bordetella parapertussis*, el gen *abfD* de *Porphyromonas gingivalis*.

60 Los enzimas con actividad de ALDC se encuentran codificados, por ejemplo, por los genes *budA* de *Klebsiella pneumoniae*, *budA* de *Klebsiella oxytoca*, *budA* de *Enterobacter aerogenes*, *salA* de *Serratia marcescens*, *alsD* de *Bacillus subtilis subtilis 168*, *alsD* de *Bacillus thuriengensis* o *PPSC2_c2281* de *Bacillus polymyxa*.

65 Los enzimas con actividad de BDH se encuentran codificados por los genes *butA* de *Corynebacterium glutamicum*, *budC* de *Klebsiella pneumoniae 342*, *budC* de *Klebsiella oxytoca*, *EAE_17490* de *Enterobacter aerogenes*, *slaC* de *Serratia marcescens*, *BDH1* y *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*, *bdhA* de *Bacillus subtilis*

subtilis 168, BMB171_C0587 de *Bacillus thuriengensis* o PPSC2_c3335 y PPSC2_c3890 de *Bacillus polymyxa*.

Cualquier proteína codificante de un gen que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% a 85%, preferentemente de 85% a 90%, más 90% a 95%, todavía más preferentemente 96%, 97%, 98% o 99% respecto a cualquiera de dichos genes.

Optimizaciones de la producción de 2,3-butanodiol

En otro aspecto de la exposición, el microorganismo recombinante se modifica adicionalmente para mejorar la disponibilidad del piruvato, mediante la atenuación de la ruta de degradación del piruvato en otro producto diferente de 2,3-butanodiol.

En la levadura, la atenuación de la producción de lactato a partir de piruvato se lleva a cabo mediante delección, en la levadura recombinante dada a conocer en la presente memoria, de por lo menos un gen seleccionado de entre *DLD1*, *CYB2*, *DLD3* y *DLD2*. Preferentemente, los genes *DLD1*, *CYB2*, *DLD3* y *DLD2* se encuentran delecionados en la levadura modificada.

Para atenuar la producción de fumarato y succinato a partir de piruvato, el gen *FUM1* se atenúa en la levadura modificada. El gen *FUM1* aparentemente resulta esencial para la levadura; de esta manera, la atenuación resulta preferente en el presente ejemplo.

Para atenuar la producción de glicerol a partir de piruvato, se elimina por lo menos un gen seleccionado de entre *HOR2*, *RHR2*, *GPD1*, *GPD2*, *GUT1* y *TDA10* en la levadura recombinante dada a conocer en la presente memoria. Preferentemente, los genes *HOR2*, *RHR2*, *GPD1*, *GPD2*, *GUT1* y *TDA10* se encuentran delecionados en la levadura modificada.

En las bacterias, la optimización de la disponibilidad del piruvato se consigue mediante la sobreexpresión, en la bacteria dada a conocer en la presente memoria, de por lo menos un gen que participa en la ruta de biosíntesis del piruvato, seleccionado de entre los genes codificantes de la fosfoglicerato mutasa (genes *gpmA* y *pgml* de *Escherichia coli* o gen homólogo), la enolasa (*eno* de *Escherichia coli* o gen homólogo) o la piruvato cinasa (genes *pykA* y *pykF* de *Escherichia coli* o gen homólogo). Alternativamente o en combinación, se atenúa por lo menos un gen que participa en la ruta de degradación del piruvato. Dicho gen se selecciona de entre el gen de la piruvato oxidasa (*poxB* de *Escherichia coli* o gen homólogo), el gen de la fosfato acetiltransferasa (*pta* de *Escherichia coli* o gen homólogo), o el de la acetato cinasa (*ackA* de *Escherichia coli* o gen homólogo) o el gen de la lactato deshidrogenasa (*ldd*, *ldhA* o *dld* de *Escherichia coli* o gen homólogo).

Bajo condiciones fermentativas (anaerobiosis, microaerobiosis o la presencia de grandes cantidades de azúcares), la levadura que producirá 2,3-butanodiol sólo podrá oxidar 50% de todo el NADH producido durante la glucólisis. Estos electrones necesitan transferirse a otros aceptores artificiales de electrones.

Por ejemplo, dichos aceptores de electrones pueden ser formas oxidadas de nitrógeno, tales como nitrato, nitrito u óxido nitroso, o el nitrógeno mismo. Determinados hongos son capaces de reducir dichos compuestos de nitrógeno a amonio bajo condiciones anaeróbicas o microaeróbicas mediante un procedimiento denominado "fermentación del amonio", tal como se indica en Zhou et al., 2002, o Takasaki et al., 2004. Estas condiciones de bajo nivel de oxígeno presentan una ventaja para la producción industrial ya que puede eliminarse el coste de la aireación. De esta manera, la ruta de producción de BDO tal como se indica en la solicitud de patente nº WO2011041426 se implementará en un organismo capaz de llevar a cabo la "fermentación del amonio" o preferentemente la ruta de fermentación se transferirá a una cepa de levadura productora de BDO. Bajo determinadas condiciones puede resultar necesario expresar una ATPasa constitutiva para reducir la cantidad de ATP en exceso en la célula.

En otro ejemplo, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADH es sustituida por un enzima dependiente de NADPH. En este caso, el organismo productor de BDO producirá un exceso de NADPH que, a su vez, podrá ser utilizado mediante la reducción asimiladora del nitrato, requiriendo la introducción de nitrato reductasa en determinadas cepas de levadura que no presentan dicho enzima.

En otro ejemplo, pueden añadirse otros sustratos aceptores de electrones. Estos pueden ser sustratos inorgánicos, tales como el sulfato y el hierro oxidado, o un sustrato orgánico, tal como, por ejemplo, la manosa, que será reducida a manitol. El exceso de NADH o NADPH también puede utilizarse para transformar las moléculas precursoras oxidadas en productos reducidos. De esta manera, el exceso de poder reductor puede utilizarse para generar coproductos valiosos que pueden recuperarse a partir del caldo de fermentación.

Resulta preferente que la ruta biosintética construida proporcione un equilibrio redox por lo menos parcial a la célula. Puede conseguirse un equilibrio redox por lo menos parcial por ejemplo incluyendo un enzima en la ruta biosintética construida que requiere NADH para su actividad. La utilización de NADH equilibra la producción de NADH durante la conversión de la glucosa en piruvato. En las células de tipo salvaje, el NADH es utilizado en la

conversión de la glucosa en glicerol, y en la producción de etanol a partir de piruvato. Las presentes células de levadura productoras adh⁺ presentan un desequilibrio de NADH debido a la disrupción en la producción de etanol. Puede utilizarse cualquier procedimiento de incremento de la actividad enzimática dependiente de NADH en la presente célula huésped productora para alcanzar el equilibrio redox. Además de incluir un enzima dependiente de NADH en la ruta biosintética, entre los procedimientos se incluyen expresar un enzima que requiera NADH pero que no sea parte de la ruta biosintética construida que utiliza piruvato. Puede expresarse un enzima dependiente de NADH equilibrador del redox a partir de un gen heterólogo.

Alternativamente, la expresión de un gen endógeno codificante de un enzima dependiente de NADH puede incrementar para proporcionar una actividad enzimática dependiente de NADH incrementada.

En la exposición, las rutas de biosíntesis 1, 5 y 6 presentan un equilibrio redox parcial mientras que las rutas 2, 3 y 4 presentan un equilibrio redox total.

15 Optimización de cepas para incrementar la producción de 2,3-butanodiol.

Importación de azúcar - Mejora en la importación de la glucosa

Al igual que las bacterias, las levaduras consumen monosacáridos y disacáridos con preferencia a otros carbohidratos. Sin embargo, en las levaduras los transportadores de azúcares principales funcionan mediante un mecanismo de difusión facilitado independiente de la energía. Estos denominados transportadores de hexosas (Hxt) y de galactosa (Gal2) muestran diferentes afinidades y especificidades para sus sustratos. Son abundantes en *S. cerevisiae* aunque mucho menos en otras cepas de levadura industrialmente importantes, incluyendo *Kluyveromyces lactis* y *Pichia stipitis* (Boles y Hollenberg, 1997; Wieczorke et al., 1999).

Un modo de mejorar la importación de la glucosa en la cepa productora de 2,3-butanodiol es la sobreexpresión de los genes codificantes de los transportadores de hexosa y galactosa o la modificación de los genes que participan en su compleja ruta reguladora, *Snf3/Rgt2-Rgt1*.

En un ejemplo, la levadura recombinante sobreexpresa por lo menos un gen de entre los siguientes: *HXT1*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* y *GAL2*.

Importación de azúcar - consumo de ATP

Tal como han identificado Larsson y colaboradores en 1997, el flujo glucolítico está condicionalmente correlacionado con la concentración de ATP en *S. cerevisiae*. El ATP presenta un fuerte efecto negativo sobre la actividad glucolítica, afectando a varios de los enzimas glucolíticos. Sin embargo, las dianas principales para la inhibición por el ATP son la fosfofructocinasa y la piruvato cinasa. Otros candidatos potenciales de enzima susceptible de inhibición por el ATP son la hexocinasa y la enolasa (Larsson et al., 1997 y 2000).

Por ejemplo, el microorganismo recombinante productor de 2,3-butanodiol resulta modificado adicionalmente para consumir su exceso de ATP mediante la sobreexpresión de la parte soluble de un enzima ATPasa. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la sobreexpresión de los genes endógenos *ATP1*, *ATP2* y *ATP3* de la cepa de levadura o mediante la introducción de genes heterólogos, tales como, por ejemplo, *atpAGD* de *E. coli*.

En otro ejemplo, se mejora la importación de la glucosa mediante la expresión de por lo menos un alelo desensibilizado de genes que es conocido que resultan inhibitorio por un exceso de ATP, tales como *PFK1*, *PFK2*, *PYK1*, *PYK2*, *HXK1*, *HXK2*, *YLR446W*, *GLK1*, *ENO1* y *ENO2*.

Importación de azúcar - Mejora de la importación de azúcares C5

La importación de pentosas por microorganismos recombinantes es un problema importante para el procedimiento industrial ya que los azúcares C5 son constituyentes mayores de la biomasa lignocelulósica hidrolizada. Las cepas nativas de *S. cerevisiae*, al igual que muchos otros tipos de levadura, son incapaces de utilizar la xilosa o la arabinosa como sustratos de fermentación (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Jin et al., 2004). Resulta interesante que sí puede incorporar xilosa, aunque este azúcar no sea un sustrato natural (Hamacher et al., 2002).

Los enzimas de *S. cerevisiae* *GAL2*, *HXT1*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5* y *HXT7* catalizan la incorporación de xilosa debido a que presentan una amplia especificidad de sustrato (Hamacher et al., 2002; Saloheimo et al., 2007; Sedlak y Ho, 2004). Sin embargo, su afinidad para la xilosa es muy inferior a la afinidad para la glucosa y la incorporación de la xilosa por los transportadores resulta fuertemente inhibida por la glucosa (Saloheimo et al., 2007).

Se requieren varios cambios para obtener una cepa capaz de crecer y consumir xilosa y/o arabinosa. Estas diferentes modificaciones son una parte de la exposición.

- Sobreexpresión de los transportadores heterólogos de xilosa

5 Con el fin de mejorar la incorporación de la xilosa y la arabinosa, la cepa recombinante productora de 2,3-BDO debe modificarse para expresar genes heterólogos codificantes de transportadores de xilosa o arabinosa. Por ejemplo, los genes GXF1, SUT1 y AT5g59250 de *Candida intermedia*, *Pichia stipitis* y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente, se sobreexpresan para mejorar la utilización de la xilosa por parte de la levadura (Runquist et al., 2010).

10 - Sobreexpresión de rutas que participan en el metabolismo de la xilosa y la arabinosa

15 Las cepas de levadura son capaces de incorporar la xilosa aunque el azúcar no sea un sustrato natural. Aunque los genes para la asimilación de la xilosa se encuentran presentes en *S. cerevisiae*, no se expresan a nivel suficiente para permitir una asimilación suficiente del azúcar. De esta manera, resultan necesarias modificaciones genéticas para mejorar la asimilación de los azúcares pentosas. Todos los enzimas que permiten la transformación de la xilosa o la arabinosa en xilitol necesitan ser potenciados, así como los enzimas que convierten el xilitol en xilulosa, y la xilulosa en xilulosa-5-fosfato.

20 Los genes homólogos de las rutas de la xilosa y de la arabinosa deben sobreexpresarse o deben sobreexpresarse genes heterólogos de bacterias.

Por ejemplo, la incorporación de la xilosa y su asimilación por parte de la cepa resultan mejoradas mediante la sobreexpresión de, por ejemplo:

25 1) el gen *XYL1* o *GR3* codificante de la aldolasa reductasa de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, respectivamente, asociados a la sobreexpresión de *XYL2* codificante de la xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis*, combinado con la sobreexpresión del gen *XKS1* o *XYL3* codificante de xilulocinasa de *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, respectivamente,

30 2) el gen *xyIA* codificante de una xilosa isomerasa de bacterias o *Piromyces* asociado a la sobreexpresión del gen *XKS1* o *XYL3* codificante de xilulocinasa de *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, respectivamente.

En otro ejemplo, la incorporación de la arabinosa y su asimilación por la cepa resultan mejorados mediante la sobreexpresión de, por ejemplo:

35 1) el gen homólogo *XYL1* o *GRE3* codificante de la aldolasa reductasa de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, respectivamente, asociados a *lad1* codificante de la L-arabinitol-4-hidrogenasa y *lxr1* codificante de una L-xilulosa-reductasa de *Trichoderma reesei*, en combinación con la sobreexpresión de *XYL2* codificante de la xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis*, y además la sobreexpresión del gen *XKS1* o *XYL3* codificante de la xilulocinasa de *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, respectivamente,

40 2) los genes heterólogos *araA* y *araB* codificantes de la arabinosa isomerasa y ribulosa cinasa bacterianas.

45 - Optimización de la ruta de las pentosas fosfato

Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la sobreexpresión de por lo menos un gen perteneciente a la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato: *TAL1*, *TKL1*, *RKL1* y *RPE1* de la cepa de levadura.

50 - Optimización de la disponibilidad de cofactores de NAPDH requeridos por los enzimas que participan en el metabolismo de los azúcares C5.

Lo anterior se consigue mediante la expresión de las transhidrogenasas de *E. coli* en la cepa de levadura. Los genes *udhA* y/o *pntAB* de *E. coli* se sobreexpresan en la cepa productora.

55 La fuente de carbonos utilizada en la presente exposición comprende hexosas o pentosas o una mezcla de las mismas.

Condiciones de cultivo

60 La invención se refiere además a un procedimiento de producción de 2,3-butanodiol (BDO) que comprende las etapas siguientes:

- proporcionar un microorganismo recombinante tal como se ha indicado anteriormente,

65 - cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono, y

- recuperar el 2,3-butanodiol.

Típicamente, los microorganismos de la invención se cultivan a una temperatura comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 37°C en un medio apropiado.

Los medios de cultivo adecuados para la levadura son medios preparados comercialmente comunes, tales como caldo que incluye base nitrogenada para levadura, sulfato amónico y dextrosa como fuente de carbono/energía o medio YPD, una mezcla de peptona, extracto de levadura y dextrosa en proporciones óptimas para el máximo crecimiento. También pueden utilizarse otros medios de cultivo definidos o sintéticos y el medio apropiado para el crecimiento del microorganismo particular es conocido por el experto en el campo de la microbiología o la ciencia de la fermentación.

La expresión "medio de cultivo apropiado", tal como se utiliza en la presente memoria para las bacterias, se refiere a un medio (por ejemplo un medio líquido estéril) que comprende nutrientes esenciales o beneficiosos para el mantenimiento y/o crecimiento de la célula, tal como fuentes de carbono o sustratos de carbono, fuentes de nitrógeno, por ejemplo, peptona, extractos de levadura, extractos de carne, extractos de malta, urea, sulfato amónico, cloruro amónico, nitrato amónico y fosfato amónico; fuentes de fósforo, por ejemplo, fosfato monopotásico o fosfato dipotásico; elementos traza (por ejemplo, sales de metal), por ejemplo sales de magnesio, sales de cobalto y/o sales de manganeso, así como factores de crecimiento, tales como aminoácidos, vitaminas, promotores del crecimiento y similares.

A título de ejemplo de medios de cultivo conocidos para *E. coli*, el medio de cultivo puede presentar una composición idéntica o similar a un medio M9 (Anderson, 1946), un medio M63 (Miller, 1992) o un medio tal como define Schaefer et al. (1999).

Los intervalos de pH adecuados para la fermentación son de pH 3,0 a pH 7,5, en donde el intervalo de pH 4,5 a pH 6,5 resulta preferente como condición inicial.

Las fermentaciones pueden llevarse a cabo bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas, en las que las condiciones anaeróbicas o microaeróbicas resultan preferentes.

La cantidad de producto en el medio de fermentación puede determinarse utilizando varios procedimientos conocidos de la técnica, por ejemplo la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o la cromatografía de gases (CG).

El presente procedimiento puede utilizar un procedimiento de fermentación por lotes. Una fermentación por lotes clásica es un sistema cerrado en el que la composición del medio se fija al inicio de la fermentación y no se somete a alteraciones artificiales durante la fermentación. De esta manera, al inicio de la fermentación, se inocula el medio con el organismo u organismos deseados y se deja que se produzca la fermentación sin añadir nada al sistema. Típicamente, sin embargo, una fermentación "por lotes" es por lotes con respecto a la adición de fuentes de carbono y con frecuencia se realizan intentos para controlar factores, tales como el pH y la concentración de oxígeno. En los sistemas por lote, las composiciones de metabolitos y de biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en que se detiene la fermentación. En los cultivos por lotes, las células progresan de una etapa de histéresis estática a una etapa de elevado crecimiento logarítmico y finalmente a una etapa estacionaria en la que disminuye o se detiene el crecimiento. Si se dejan sin tratar, las células en etapa estacionaria finalmente morirán. Las células en etapa logarítmica generalmente son responsables de la parte principal de producción del producto final o intermediario.

En la presente invención también puede utilizarse un sistema de alimentación por lotes. Un sistema de alimentación por lotes es similar a un sistema por lotes típico con la excepción de que el sustrato de fuente de carbono se añade en incrementos a medida que progresa la fermentación. Los sistemas de alimentación por lotes resultan útiles en el caso de que la represión por catabolito (por ejemplo la represión por glucosa) es capaz de inhibir el metabolismo de las células y en el caso de que resulte deseable disponer de cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medición de la concentración real de sustrato en los sistemas alimentados por lotes resulta difícil y, por lo tanto, se estima basándose en los cambios de factores medibles, tales como el pH, el oxígeno disuelto y la presión parcial de gases de desecho tales como el CO₂.

Las fermentaciones son comunes y bien conocidas de la técnica y pueden encontrarse ejemplos en Sunderland et al. (1992). Aunque la presente invención se lleva a cabo en modo por lotes, se encuentra contemplado que el procedimiento sería adaptable a la fermentación continua.

La fermentación continua es un sistema abierto en el que se añade continuamente un medio de fermentación definido a un biorreactor y se retira una cantidad igual de medio condicionado simultáneamente para el procesamiento. La fermentación continua generalmente mantiene los cultivos a una densidad elevada constante en la que las células se encuentran principalmente en crecimiento en etapa logarítmica.

La fermentación continua permite la modulación de un factor o de cualquier número de factores que afectan al crecimiento celular o a la concentración del producto final. Por ejemplo, un procedimiento mantendrá un nutriente limitante, tal como el nivel la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno a una tasa fija y permitirá que todos los demás parámetros varíen. En otros sistemas, varios factores que afectan al crecimiento pueden alterarse continuamente, mientras que la densidad celular, medida a partir de la turbidez del medio, se mantiene constante. Los sistemas continuos intentan mantener las condiciones de crecimiento de estado estable y, de esta manera, la pérdida de células debida a que se retira medio debe equilibrarse con la tasa de crecimiento celular en la fermentación. Los procedimientos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para procedimientos de fermentación continua, así como las técnicas para maximizar la tasa de formación de producto son bien conocidas de la técnica de la microbiología industrial.

Se encuentra contemplado que la presente invención puede ponerse en práctica utilizando procedimientos por lotes, por lotes alimentados o continuos y que resultaría adecuado cualquier modo de fermentación conocido. Además, se encuentra contemplado que las células pueden inmovilizarse sobre un sustrato en forma de catalizadores de células completas y someterse a condiciones de fermentación para la producción.

Purificación del 2,3-butanodiol

Según un aspecto específico de la invención, la producción fermentativa de 2,3-butanodiol comprende una etapa de aislamiento del 2,3-butanodiol a partir del medio de cultivo. La recuperación de, 2,3-butanodiol a partir del medio de cultivo es una tarea rutinaria para el experto en la materia. Puede llevarse a cabo mediante varias técnicas bien conocidas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, la destilación, el arrastre con gases, la pervaporación o la extracción líquida. El experto en la materia conoce cómo adaptar los parámetros de cada técnica dependientes de las características del material que debe separarse.

La destilación puede implicar un componente opcional diferente del medio de cultivo con el fin de facilitar el aislamiento del 2,3-butanodiol mediante la formación de azeotropo y notablemente con agua. Este componente opcional es un solvente orgánico, tal como ciclohexano, pentano, butanol, benceno, tolueno, tricloroetileno, octano, éter dietílico o una mezcla de los mismos.

El arrastre con un gas se lleva a cabo con un gas de arrastre seleccionado de entre helio, argón, dióxido de carbono, hidrógeno, nitrógeno o una mezcla de los mismos.

La extracción con un líquido se lleva a cabo con un solvente orgánico como la fase hidrofóbica, tal como pentano, hexano, heptano y dodecano.

Las condiciones de purificación pueden adaptarse específicamente a la transformación posterior del 2,3-BDO en 1,3-butadieno, incluyendo el mantenimiento de varios coproductos en el 2,3-BDO parcialmente purificado.

Ejemplos

La presente exposición se define adicionalmente en los ejemplos siguientes. Debe entenderse que los presentes ejemplos, aunque indican formas de realización preferentes de la invención, se proporcionan únicamente a título ilustrativo. A partir de la exposición anterior y los presentes ejemplos, el experto en la materia podrá realizar diversos cambios en la invención a fin de adaptarla a diversos usos y condiciones sin modificar los medios esenciales de la invención.

En particular, los ejemplos muestran cepas recombinantes de *Escherichia coli* (*E. coli*) y cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), aunque las modificaciones genéticas descritas en la presente memoria pueden llevarse a cabo fácilmente en otros microorganismos de la misma familia.

E. coli pertenece a la familia de las enterobacteriáceas, que comprende miembros que son Gram-negativos, con forma de bacilo, no formadores de esporas y presentan típicamente una longitud de 1 a 5 µm. La mayoría de miembros presenta flagelos que utilizan para desplazarse, aunque unos cuantos géneros son no móviles. Muchos miembros de dicha familia constituyen una parte normal de la flora intestinal presente en los intestinos del ser humano y de otros animales, mientras que otros se encuentran en agua o el suelo, o son parásitos de una diversidad de diferentes animales y plantas. *E. coli* es uno de los organismos modelo más importantes, aunque entre otros miembros importantes de la familia de las enterobacteriáceas se incluyen *Klebsiella*, en particular *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* o *Klebsiella oxytoca*, y *Salmonella*.

S. cerevisiae es un organismo modelo y pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*, que comprende miembros que son células esféricas, elípticas u oblongo-acuminadas con una reproducción asexual mediante gemación y típicamente presentan un diámetro de entre 5 y 10 µm. Muchos miembros son utilizados para la producción industrial debido a su capacidad fermentativa. *S. cerevisiae* es uno de los organismos modelo más importantes aunque entre otros miembros importantes de la familia *Saccharomycetaceae* se incluyen *Pichia*, *Candida* y *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia angusta*.

Tabla 1: genotipo y número correspondiente de cepas intermediarias y cepas productoras indicadas en los ejemplos siguientes.

Número de cepa	Genotipo
1 (MG1655)	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>
2	MG1655 Δ <i>poxB</i> Δ <i>ldhA</i>
3	MG1655 Δ <i>poxB</i> Δ <i>ldhA</i> Δ <i>ackA-pta::Km</i>
4	MG1655 Δ <i>poxB</i> Δ <i>lphA</i> Δ <i>ackA-pta::Km</i> pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2- <i>pdC1sc</i> pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2- <i>budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB</i>
5	MG1655 Δ <i>poxB</i> Δ <i>lphA</i> Δ <i>ackA-pta::Km</i> (pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2- <i>pdC1sc</i>) (pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2- <i>budCkp-Vtrc01/RBS01*2-pflB-Ptrc01/RBS01*2-mhpF-TT07</i>)
6	MG1655 Δ <i>poxB</i> Δ <i>lphA</i> Ptrc157- <i>aceEF::Km</i>
7	MG1655 Δ <i>poxB</i> Δ <i>ldhA</i> Ptrc157- <i>aceEF::Km</i> (pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2- <i>budCkp-Ptrc01/RBS01*2-alsSko1ec-TT07</i>) (pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2- <i>ilv6scO1ec-TT07</i>)
8	MG1655 Δ <i>poxB</i> Δ <i>lphA</i> Δ <i>ackA-pta::Km</i> Ptrc01/E06/RBS01*2- <i>pflA::Cm</i>
9	MG1655 Δ <i>poxB</i> Δ <i>lphA</i> Δ <i>ackA-pta::Km</i> Ptrc01/E06/RBS01*2- <i>pflA::Cm</i> (pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2- <i>pdC1sc</i>) (pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2- <i>budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB-UTR-acoABbs-TT07</i>)
10 (CEN.PK2-1C)	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3Δ 1 MAL2-8^C SUC2</i>
11	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3Δ 1 MAL2-8^C SUC2 Δadh1 Δadh3 Δadh5::Gn</i>
12	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3Δ 1 MAL2-8^C SUC2 Δadh1 Δadh3 Δadh5::Gn Δilv2::Hg</i>
13	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3Δ 1 MAL2-8^C SUC2 Δadh1 Δadh3 Δadh5::Gn Δilv2::Hg (p424-Phxt7-<i>bdh1-TTcyc1</i>) (p426-Phxt7-<i>mhpFec-TTcyc1</i>) (p423-Phxt7-<i>pflAec-TTcyc1-Ppgk1-pflBec-TTpdC1</i>)</i>
14	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3Δ 1 MAL2-8^C SUC2 Δadh1 Δadh3 Δadh5::Gn Δilv2::Hg (p424-Phxt7-<i>bdh1-TTcyc1</i>) (p426-Phxt7-<i>acoAbs-TTcyc1-Ppgk1-acoBbs-TTpdC1</i>) (p423-Phxt7-<i>pflAec-TTcyc1-Ppgk1-pflBec-TTpdC1</i>)</i>

5

Protocolos:

Las cepas de *E. coli* manipuladas para producir 2,3-BDO se generaron utilizando procedimientos descritos en la solicitud de patente nº WO2010/076324. La disrupción génica en el locus cromosómico especificado se llevó a cabo mediante recombinación homóloga tal como se indica en Datsenko y Wanner (2000). El casete de resistente a antibióticos puede amplificarse en pKD3, pKD4, pKD13 o cualquier otro plásmido que contiene otro gen de resistencia a antibióticos circundado por sitios FRT. Las modificaciones cromosómicas se transfirieron a una cepa *E. coli* receptora dada mediante transducción de P1.

Las cepas de levadura manipuladas para producir 2,3-BDO se generaron utilizando procedimientos descritos por Baudin et al. (1993) y Wach et al. (1994). Las deleciones cromosómicas utilizaron una estrategia de eliminación generada por PCR para sustituir el marco de lectura abierta de levadura de interés desde su codón de inicio a su condón de parada por un módulo de casete de resistencia (KanMX que confiere resistencia a geneticina o Hph (higromicina B fosfotransferasa) que confiere resistencia a la higromicina B). Se llevaron a cabo construcciones de plásmido mediante recombinación homóloga tal como se indica en Ma et al. (1987) y Raymond et al. (1999).

Ejemplo 1: construcción de la cepa 5: sobreexpresión de genes de piruvato descarboxilasa, piruvato formato liasa, acetaldehído deshidrogenasa y butanodiol deshidrogenasa en *E. coli*

Construcción de la cepa 2

Con el fin de evitar la acumulación de acetato y el consumo de piruvato durante el cultivo de células de *E. coli*, se delecionó el gen *poxB* codificante de piruvato oxidasa mediante la utilización de los cebadores DpoxB-F (SEC ID nº 01) y DpoxB-R (SEC ID nº 02).

Con el fin de evitar la acumulación de lactato y el consumo de piruvato durante el cultivo de células de *E. coli*, se delecionó el gen *ldhA* codificante de lactato deshidrogenasa mediante la utilización de los cebadores DldhA-F (SEC ID nº 03) y DldhA-R (SEC ID nº 04).

Se introdujeron ambas deleciones en MG1655 utilizando el procedimiento de recombinación homóloga en *Escherichia coli* (Datsenko y Wanner, 2000). Este procedimiento permitió la combinación de múltiples modificaciones genéticas utilizando diferentes genes de resistencia a antibióticos que pueden eliminarse. La cepa resultante MG1655 Δ *poxB* Δ *ldhA* se denominó cepa 2 (Tabla 1).

Construcción de la cepa 3

5 Con el fin de evitar la acumulación de acetato durante el cultivo, se llevó a cabo la delección de la unidad de transcripción *ackA-pta*. La producción de acetato mediante la ruta de AckA-Pta contiene dos enzimas: la fosfotransacetilasa (*pta*), que convierte reversiblemente el acetil-CoA, y el fosfato inorgánico en fosfato de acetilo y CoA, y la acetato cinasa (*ackA*), que convierte reversiblemente el acetilfosfato y el ADP en acetato y ATP.

10 Se eliminó la unidad de transcripción *ackA-pta* mediante la utilización de los cebadores DackA-pta-F (SEC ID nº 05) y DackA-pta-R (SEC ID nº 06) y se indujo en la cepa 2 mediante transducción de P1. La cepa validada MG1655 Δ *poxB* Δ *ldhA* Δ *ackA-pta::Km* se denominó cepa 3 (Tabla 1).

Construcción de la cepa 415 Construcción del plásmido pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-pdc1sc

El plásmido pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-PDC1sc se obtuvo de pCL1920 (Lerner y Inouye, 1990, NAR 18, 15 p 4631), el gen *PDC1sc* codificante de la piruvato descarboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae* S288C, la expresión de la cual está controlada por un promotor *Ptrc* constitutivo y una secuencia de RBS optimizada. El gen *PDC1sc* se amplificó por PCR con los cebadores *Ptrc01/E02/RBS01*2-pdc1sc* F (SEC ID nº 07) y *pdc1sc* R (SEC ID nº 08) utilizando ADM genómico de la cepa de referencia S288C de *Saccharomyces cerevisiae* y se clonó entre los sitios de restricción *SacI* y *BamHI* del plásmido pCL1920. El plásmido resultante se denominó *pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-pdc1sc*.

25 Construcción del plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB

El plásmido *pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB* se obtuvo del plásmido pBBR1MCS5 (M. E. Kovach, Gene 166:175-176, 1995), el gen sintético *budCkp* codificante de la butanodiol deshidrogenasa y gen *pflB* de *E. coli* codificante de piruvato formato liasa. En este plásmido, la expresión del gen sintético *budCkp* y del gen *pflB* están controlados por promotores *trc* constitutivos independientes y secuencias RBS optimizadas.

Gen sintético budC

35 Un gen sintético *budC* de *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 codificante de la butanodiol deshidrogenasa (acetoína reductasa) fue sintetizado por Life Technologies (SEC ID nº 54). Se clonó el constructo en el vector pM del proveedor y se verificó mediante secuenciación.

40 Construcción del plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp

El fragmento *Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp* se amplificó por PCR con los cebadores *Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp* F (SEC ID nº 09) y *budCkp* R (SEC ID nº 10) utilizando el vector pMA-T-*budCkp* proporcionado por el proveedor entre los sitios *SacI* y *XbaI* del plásmido pBBR1MCS5. El plásmido resultante se denominó *pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp*.

45 Construcción del plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB

Con el fin de incrementar el pool de acetil-CoA en la célula, se sobreexpresó el gen *pflB* de *E. coli*. Este enzima cataliza mediante una reacción basada en un radical sensible al oxígeno la síntesis de acetil-CoA a partir de piruvato sin consumo de ATP.

50 Se amplificó por PCR el fragmento "*Ptrc01/RBS01*2-pflB*" con los cebadores *Ptrc01-pflB-SpeI* F (SEC ID nº 11) y *pflB-EcoRI* R (SEC ID nº 12) utilizando el ADN genómico de *E. coli* MG1655 y se clonó entre los sitios *SpeI* y *EcoRI* del plásmido *pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp* indicado anteriormente. El plásmido resultante se denominó *pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB*.

Construcción de la cepa 4

60 Se introdujeron *pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-pdc1sc* y *pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB* mediante electroporación en la cepa 3 (Tabla 1). La cepa resultante MG1655 Δ *poxB* Δ *ldhA* Δ *ackA-pta::Km* (*pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-pdc1sc*) (*pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB*) se denominó cepa 4 (Tabla 1).

Construcción de la cepa 5

65 Construcción del plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB-Ptrc01/RBS01*2-

mhpF-TT07

El plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS0 *2-budCkp-Ptrc01/RBS01 *2-pflB-Ptrc01/RBS01*2-mhpF-TT07 se obtuvo de pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB, indicado anteriormente y el gen *mhpF* codificante de la acetaldehído deshidrogenasa de *E. coli*.

En dicho plásmido, la expresión del gen *mhpF* está controlada por un promotor *trc* constitutivo y secuencia RBS optimizada. Se añadió un terminador transcripcional al final del constructo, después del gen *mhpF*.

Se amplificó el gen *mhpF* por PCR con los cebadores Ptrc01-mhpF F (SEC ID n°13) y Ptrc01-mhpF-TT07 R (SEC ID n°14) utilizando ADN genómico de *E. coli* MG1655 y se clonó entre los sitios de restricción *ApaI* y *EcoRI* del plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB (indicado anteriormente). El plásmido resultante se denominó pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01 *2-pflB-Ptrc01/RBS01 *2-mhpF-TT07.

Construcción de la cepa 5

La cepa manipulada que muestra una producción incrementada de 2,3-BDO expresaba el gen *pflB* para producir acetilCoA, el gen *mhpF* para convertir el acetil-CoA en acetaldehído, el *PDC1* de *Saccharomyces cerevisiae* para convertir el piruvato y el acetaldehído en acetoina y el gen sintético *budCkp* para convertir finalmente la acetoina en 2,3-butanodiol.

Se introdujeron pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-pdclsc y pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB-Ptrc01/RBS01*2-mhpF-TT07 mediante electroporación en la cepa 3 (Tabla 1). La cepa resultante, MG1655 Δ poxB Δ lpha Δ ackA-pta::Km (pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-pdclsc) (pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-pflB-Ptrc01/RBS01 *2-mhpF-TT07) se denominó cepa 5 (Tabla 1).

Ejemplo de referencia 2: construcción de la cepa 7: sobreexpresión de los genes de acetolactato sintasa, diacetil sintasa y butanodiol deshidrogenasa en *E. coli*

Construcción de la cepa 6

Con el fin de mantener el pool de piruvato, que es un precursor de la 2,3-BDO, se atenuó la expresión del operón *aceEF* codificante de las subunidades E1 y E2 de la piruvato deshidrogenasa, respectivamente, mediante la adición de un promotor constitutivo *trc* débil y un terminador transcripcional anterior al gen *aceE* y mediante la utilización de Ptrc157-aceE F (SEC ID n° 15) y Ptrc157-aceE R (SEC ID n° 16).

Se introdujo la atenuación cromosómica del operón *aceEF* en MG1655 utilizando la recombinación homóloga (Datsenko y Wanner, 2000) y después se transfirió mediante transducción de PI en la cepa 2 (Tabla 1). La cepa resultante, MG1655 Δ poxB Δ lpha Ptrc157-aceEF::Km, se denominó cepa 6 (Tabla 1).

Construcción de la cepa 7Construcción del plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-alsSkpO1ec-TT07

Se obtuvo el plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp-Ptrc01/RBS01*2-alsSkpO1ec-TT07 a partir de pBBR 1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp, descrito en el ejemplo 1, y el gen sintético *alsSkpO1ec* la expresión del cual estaba controlada por un promotor constitutivo *trc* independiente y una secuencia RBS optimizada. Se añadió un terminador transcripcional en el extremo del constructo, posterior al gen *alsSkpO1ec*.

Gen sintético *alsSkpO1ec*

Un gen sintético del gen *alsS* de *Klebsiella pneumoniae* 342 codificante de la acetolactato sintasa (KPK_2270) fue sintetizado por Life Technologies (SEC ID n° 55). El constructo se clonó en el vector pM del proveedor y se verificó mediante secuenciación:

el gen sintético *alsSkpO1ec* se amplificó mediante PCR con los cebadores Ptrc01/RBS01*2-alsSkpO1ec F (SEC ID n° 17) y EcoRI-alsSkpO1ec-TT07 R (SEC ID n° 18) mediante la utilización del plásmido pMK-alsSkpO1ec proporcionado por el proveedor entre los sitios *BamHI* y *EcoRI* del plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp. El plásmido resultante se denominó pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-budCkp- Ptrc01/RBS01*2-alsSkpO1ec-TT07.

Construcción del plásmido pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-ilv6scO1ec-TT07

El plásmido pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-ilv6scO1ec-TT07 se obtuvo a partir de pCL1920 (Lerner y Inouye, NAR 18, 15 p 4631, 1990) y el gen sintético *ilv6cO1ec* codificante de la diacetil sintasa de *Saccharomyces*

cerevisiae S288C, la expresión del cual estaba controlada por un promotor *trc* constitutivo y una secuencia RBS optimizada. Se añadió un terminador transcripcional en el extremo del constructo.

Gen sintético *ilv6cO1ec*

5 El gen sintético del gen *ILV6* de *Saccharomyces cerevisiae* S288C codificante de la subunidad pequeña de la diacetil sintasa (P25605) fue sintetizado por Life Technologies (SEC ID n° 56). El constructo se clonó en el vector pM del proveedor y se verificó mediante secuenciación. El gen sintético *ilv6cO1ec* se amplificó mediante PCR
10 utilizando el cebador Pilv6scO1ec-TT07 R (SEC ID n° 20) utilizando el plásmido pMA-*ilv6cO1ec* proporcionado por el proveedor y clonado entre los sitios *SacI* y *KpnI* del plásmido pCL1920. El plásmido resultante se denominó pCL1920-Pilv6scO1ec-TT07.

Construcción de la cepa 7

15 La cepa manipulada, que muestra una producción incrementada de 2,3-BDO, expresaba el gen *alsS* optimizado de *Klebsiella pneumoniae* para producir acetolactato a partir de piruvato; el gen *ILV6* optimizado de *Saccharomyces cerevisiae* para convertir el acetolactato en diacetilo y el gen *budC* de *Klebsiella pneumoniae* para convertir finalmente el diacetilo en acetoína y seguidamente en 2,3-butanodiol.

20 Ambos plásmidos, pBBR1MCS5-PbudCkp-PalsSkpO1ec-TT07 y pCL1920-Pilv6scO1ec-TT07, fueron introducidos mediante electroporación en la cepa 6 (Tabla 1). La cepa resultante, MG1655 Δ *poxB* Δ *lpha* PaceEF::Km (pBBR1MCS5-PbudCkp-PalsSkpO1ec-TT07) (pCL1920-Pilv6scO1ec-TT07) se denominó cepa 7 (Tabla 1).

25 **Ejemplo de referencia 3: construcción de la cepa 9: sobreexpresión de los genes de piruvato descarboxilasa, piruvato formato liasa, acetoína deshidrogenasa y butanodiol deshidrogenasa en *E. coli***

Construcción de la cepa 8

30 Con el fin de incrementar la producción de acetyl-CoA a partir de piruvato, se sobreexpresa el gen *pflB* de la piruvato formato liasa (PFL). Debido a que la PFL funciona como un dímero de PflB, la maduración del cual requiere el enzima PflAE, se sobreexpresa el gen *pflA*. Con este propósito, se insertó un promotor *trc* constitutivo fuerte y una secuencia de consenso RBS delante del marco de lectura abierto de *pflA* en el cromosoma mediante la utilización del procedimiento de recombinación homóloga descrito por Datsenko y Wanner (2000).
35

Se llevó a cabo una PCR solapante entre el fragmento del casete de resistencia Cm (PpflA F (SEC ID n° 21) y PpflA R (SEC ID n° 22) y el fragmento homólogo respecto al inicio del gen *pflA* (*pflA* R (SEC ID n° 23) y *pflA* F (SEC ID n° 24) mediante la utilización de *pflA* F (SEC ID n° 24) y RI *pflB* R (SEC ID n° 25) y se introdujo en la cepa MG1655. A continuación, se transfirió la modificación cromosómica del promotor *pflA* mediante transducción de P1 en la cepa 3 (Tabla 1). La cepa resultante MG1655 Δ *poxB* Δ *lpha* Δ *ackA-pta*::Km PpflA::Cm se denominó cepa 8 (Tabla 1).
40

Construcción de la cepa 9

45 Construcción del plásmido pBBR1MCS5-PbudCkp-PpflB-UTR-*acoABbs*-TT07

50 El plásmido pBBR1MCS5-PbudCkp-PpflB-UTR-*acoABbs*-TT07 se obtuvo a partir del plásmido pBBR1MCS5-PbudCkp-PpflB indicado en el ejemplo 1 y el operón *acoAlacoB* de *Bacillus subtilis* 168 codificante de las subunidades alfa y beta de la acetoína deshidrogenasa, respectivamente, la expresión de la cual estaba controlada por el mismo promotor *P constitutivo que el gen *pflB* y su propia región 5' no traducida. Se añadió un terminador transcripcional en el extremo del constructo.
55*

Construcción del plásmido pBBR1MCS5-PbudCkp-PpflB-UTR-*acoABbs*-TT07

60 El fragmento *UTR-acoABbs*-TT07 se amplificó mediante PCR con los cebadores PacoAB IF F (2) (SEC ID n° 26) y *acoABbs*-TT07 IF R (SEC ID n° 27) utilizando ADN genómico de *Bacillus subtilis* 168 y se clonó entre los sitios de restricción *HindIII* y *EcoRI* del plásmido pBBR1MCS5-PbudCkp-PpflB (indicado en el Ejemplo 1). El plásmido resultante se denominó pBBR1MCS5-PbudCkp-PpflB-UTR-*acoABbs*-TT07.

Construcción de la cepa 9

La cepa manipulada, que mostraba una producción incrementada de 2,3-BDO, expresaba los genes *pflB* y *pflA*, de producción de acetil-CoA, el gen *PDC1* de *Saccharomyces cerevisiae*, de conversión del piruvato en acetaldehído, los genes naturales *acoA* y *acoB* de *Bacillus subtilis* de condensación de acetil-CoA y acetaldehído en acetoina y el gen *budC* optimizado de *Klebsiella pneumoniae* de conversión fina de la acetoina en 2,3-butanodiol.

Se introdujeron los plásmidos pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-*pdC1sc* y pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-*budCkp*-Ptrc01/RBS01*2-*pflB*-UTR-*acoABbs*-TT07 mediante electroporación en la cepa 8 (Tabla 1). La cepa resultante, MG1655 Δ *poxB* Δ *dhA* Δ *ackA-pta::Km* Ptrc01/E06/RBS01*2-*pflA::Cm* (pCL1920-Ptrc01/E02/RBS01*2-*pdC1sc*) (pBBR1MCS5-Ptrc01/E02/RBS01*2-*budCkp*-Ptrc01/RBS01*2-*pflB*-UTR-*acoABbs*-TT07) se denominó cepa 9 (Tabla 1).

Ejemplo 4: construcción de la cepa 13: sobreexpresión de los genes de la piruvato formato liasa, del enzima activador de la piruvato formato liasa, de la acetaldehído deshidrogenasa y de la butanodiol deshidrogenasa en *S. cerevisiae*Construcción de la cepa 11

Con el fin de bloquear la producción de etanol, se manipularon sucesivamente deleciones de los genes *ADH1*, *ADH3* y *ADH5*, codificantes de las tres alcohol-deshidrogenasas principales, mediante la utilización del sistema de recombinasa *lox::kanMX::loxP/Cre* y la tecnología de PCR de sustitución por homología de secuencias flanqueantes cortas, descrita por Guldener *et al.*, 1996.

Se deleccionó cada gen mediante la introducción de un casete de deleción génica que contenía *loxP*-*kanMX*-*loxP* que confería resistencia a la geneticina y región homóloga cadena arriba y abajo de la región codificante del gen de interés. Se amplificó mediante PCR cada casete de deleción a partir del plásmido pUG6 (Guldener *et al.*, 1996) con los cebadores *adh1::kanMXlox fwd* (SEC ID n° 28) y *adh1::kanMXloxrev* (SEC ID n° 29) para la deleción del gen *ADH1*, *adh3::kanMXlox fwd* (SEC ID n° 30) y *adh3::kanMXloxrev* (SEC ID n° 31) para la deleción del gen *ADH3* y *Adh5::kanMXlox fwd* (SEC ID n° 32) y *Adh5::KanMXloxrev* (SEC ID n° 33) para la deleción del gen *ADH5*. Los productos de PCR se transformaron en levaduras tal como describen Gietz *et al.* (2002 y 2007). Se eliminó el casete de selección *loxP*-*kanMX*-*loxP* en el locus *ADH1* y después en el locus *ADH3* mediante la transformación con pSH47 codificante de recombinasa *Cre* inducible por galactosa (Guldener *et al.*, 1996). La cepa seleccionada y verificada CEN.PK2-1C Δ *adh1* Δ *adh3* Δ *adh5::Gn* se denominó cepa 11 (Tabla 1).

Construcción de la cepa 12

Con el fin de eliminar la ruta natural de producción de 2.3BDO en la levadura, se llevó a cabo tal como se ha descrito con anterioridad la deleción del gen *LV2*, que codifica la subunidad catalítica de la acetolactato sintasa, excepto en que, en lugar del casete de resistencia a la geneticina, se amplificó el casete de resistencia a la higromicina B (*hphNT1*) mediante la utilización de los cebadores *ilv2::hphNT1loxrfwd* (SEC ID n° 34) e *ilv2::hphNT1loxrev* (SEC ID n° 35). El producto de PCR se transformó en la cepa 11 (Tabla 1) tal como han descrito Gietz *et al.* (2002 y 2007). La cepa seleccionada y verificada CEN.PK2-1C Δ *adh1* Δ *adh3* Δ *adh5::Gn* Δ *ilv2::Hg* se denominó cepa 12 (Tabla 1).

Construcción de la cepa 13Construcción del plásmido p424-Phxt7-*bdh1*-TTcyc1

El plásmido p424-*Phxt7*-*bdh1*-TTcyc1 se obtuvo a partir del plásmido p424H7 (Wieczorke *et al.* 1999 y Hamacher *et al.* 2002) y el gen *BDH1* codificante de la 2,3-butanodiol deshidrogenasa más activa, bajo el control del promotor HXT7 truncado y se añadió el terminador *CYC1* al extremo del gen para la terminación de la transcripción.

La región codificante de *BDH1* se amplificó mediante PCR con A-*BDH1*-f (SEC ID n° 36) y A-*BDH1*-r (SEC ID n° 37) del ADN genómico de *S. cerevisiae* S288C y se clonó mediante clonación por recombinación en el plásmido p424H7 digerido con *Bam*HI/*Xho*I. El plásmido verificado y secuenciado se denominó p424-*Phxt7*-*bdh1*-TTcyc1.

Construcción del plásmido p426-Phxt7-*mhpFec*-TTcyc1

El plásmido p426-*Phxt7*-*mhpFec*-TTcyc1 se obtuvo a partir del plásmido p426H7 (Wieczorke *et al.* 1999 y Hamacher *et al.* 2002) y el gen *mhpF* codificante de la acetaldehído deshidrogenasa de *Escherichia coli* bajo el control del promotor HXT7 truncado y se añadió el terminador *CYC1* al extremo del gen para la terminación de la transcripción.

Se amplificó mediante PCR la región codificante del gen *mhpF* con *mhpF*-f (SEC ID n° 38) y *mhpF*-r (SEC ID n°

39) del ADN genómico de *E. coli* MG1655 y se clonó mediante clonación por recombinación en el plásmido p426H7 digerido con *Bam*HI/*Xho*I. El plásmido verificado y secuenciado se denominó p426-*Phxt7-mhpFec-TCyc1*.

5 Construcción del plásmido p423-*Phxt7-pflAec-TCyc1-Ppgk1-pflBec-TPdc1*

El plásmido p423-*Phxt7-pflAec-TCyc1-Ppgk1-pflBec-TPdc1* se obtuvo a partir del plásmido p423H7 (Wieczorke *et al.* 1999 y Hamacher *et al.* 2002). El gen *pflA* codificante del enzima activador de la piruvato formato liasa de *Escherichia coli* se clonó bajo el control del promotor *HXT7* truncado y el gen *pflB* codificante de la piruvato formato liasa clonado bajo el control del promotor *PGK1*. Los terminadores *CYC1* y *PDC1* se añadieron, respectivamente, en el extremo de los genes *pflA* y *pflB* para la terminación de la transcripción.

Se amplificaron mediante PCR las regiones codificantes de los genes *pflA* y *pflB* genes utilizando los cebadores siguientes:

- 15 – *pflA*-f (SEC ID n°40) y *pflA*-r (SEC ID n°41);
- A-EcPFLB-f (SEC ID n°42) y A-EcPFLB-r (SEC ID n°43), respectivamente, mediante la utilización de ADN genómico de *E. coli* MG1655.

20 Se amplificaron los terminadores *CYC1* y *PDC1* y el promotor *PGK1* utilizando los cebadores siguientes:

- A-tCYC1-f (SEQ ID n° 44) y A-tCYC1-r (SEC ID n° 45)
- 25 – A-tPDC1-f (SEQ ID n° 46) y A-tPDC1-r (SEC ID n° 47)
- A-pPGK1-f (SEQ ID n° 48) y A-pPGK1-r (SEC ID n° 49), respectivamente mediante la utilización de ADN genómico de *S. cerevisiae* S288C.

30 El ensamblaje de cada fragmento de PCR en el plásmido p423H7 digerido con *Bam*HI/*Pst*I mediante clonación por recombinación. El plásmido verificado y secuenciado se denominó p423-*Phxt7-pflAec-TCyc1-Ppgk1-pflBec-TPdc1*.

35 Construcción de la cepa 13

La cepa manipulada que muestra una producción de 2,3-BDO incrementada expresaba los genes *pflB* y *pflA* de *E. coli* para producir acetil-CoA, el gen *mhpF* de *E. coli* para convertir el acetil-CoA en acetaldehído, la expresión endógena del gen *PDC1* para convertir el piruvato y el acetaldehído en acetoína y el gen *BDH1* sobreexpresado para convertir finalmente la acetoína en 2,3-butanodiol.

40 Se introdujeron los plásmidos p424-*Phxt7-bdh1-TCyc1*, p426-*Phxt7-mhpFec-TCyc1* y p423-*Phxt7-pflAec-TCyc1-Ppgk1-pflBec-TPdc1* en la cepa 12 (Tabla 1) mediante transformación siguiendo el protocolo de Gietz *et al.* (2007). La cepa resultante, CEN.PK2-1C $\Delta adh1 \Delta adh3 \Delta adh5::Gn Div2::Hg$ (p424-*Phxt7-bdh1-TCyc1*) (p426-*Phxt7-mhpFec-TCyc1*) (p423-*Phxt7-pflAec-TCyc1-Ppgk1-pflBec-TPdc1*) se denominó cepa 13.

45 **Ejemplo 5: construcción de la cepa 14: sobreexpresión de los genes de la piruvato formato liasa, el enzima activador de la piruvato formato liasa y la butanodiol deshidrogenasa en *S. cerevisiae***

50 Construcción de la cepa 14

Construcción del plásmido p426-*Phxt7-acoAbs-TCyc1-Ppgk1-acoBbs-TPdc1*

Con el fin de mejorar la condensación del acetil-CoA y el acetaldehído en acetoína, se sobreexpresó el complejo de reducción de la acetoína *acoAB* de *Bacillus subtilis*.

55 El plásmido p426-*Phxt7-acoAbs-TCyc1-Ppgk1-acoBbs-TPdc1* se obtuvo del plásmido p426H7 (Wieczorke *et al.* 1999 y Hamacher *et al.* 2002) y los genes *acoAbs* / *acoBbs* bajo el control de los promotores *HXT7* y *PGK1* truncados, respectivamente. Se añadieron los terminadores *CYC1* y *PDC1*, respectivamente, en el extremo de los genes *acoA* y *acoB* para la terminación de la transcripción.

60 La región codificante de los genes *acoA* y *acoB* se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores siguientes:

- 65 – A-acoA-f (SEC ID n° 50) y A-acoA-r (SEC ID n° 51)

- A-acoB-f (SEC ID n° 52) y acoB-r (SEC ID n° 53), respectivamente, mediante la utilización del ADN genómico de *Bacillus subtilis* 168.

Se amplificaron los terminadores *CYC1* y *PDC1* y el promotor *PGK1* tal como se indica en el ejemplo 4.

El ensamblaje de cada fragmento de PCR en el plásmido p426H7 digerido con *Bam*HI/*Kpn*I se llevó a cabo mediante clonación por recombinación. El plásmido verificado y secuenciado se denominó p426-*Phxt7-acoAbs-TTcyc1-Ppgk1-acoBbs-TTpdcl*.

Construcción de la cepa 14

La cepa manipulada que muestra una producción de 2,3-BDO incrementada expresaba los genes *pflB* y *pflA* para producir el acetil-CoA, la expresión endógena de *PDC1* para convertir el piruvato en acetoína, los genes *acoA* y *acoB* de *Bacillus subtilis* para condensar el acetil-CoA y el acetaldehído para producir acetoína y el gen *BDH1* sobreexpresado para convertir finalmente la acetoína en 2,3-butanodiol.

Se introdujeron los plásmidos p424-*Phxt7-bdh1-TTcyc1*, p426-*Phxt7-acoAbs-TTcyc1-Ppgk1-acoBbs-TTpdcl* y p423-*Phxt7-pflAec-TTcyc1-Ppgk1-pflBec-TTpdcl* en la cepa 12 (Tabla 1) mediante transformación según el protocolo de Gietz *et al.* (2007). La cepa resultante, CEN.PK2-1C $\Delta adh1 \Delta ads3 \Delta adh5::Gn Dilv2::Hg$ (p424-*Phxt7-bdh1-TTcyc1*) (p426-*Phxt7-acoAbs-TTcyc1-Ppgk1-acoBbs-TTpdcl*) (p423-*Phxt7-pflAec-TTcyc1-Ppgk1-pflBec-TTpdcl*) se denominó cepa 14 (Tabla 1).

Ejemplo 6: producción de 2.3BDO en matraz de agitación

E. coli

Ruta 3

Se evaluaron las cepas de producción en matraces Erlenmeyer pequeños utilizando medio M9 modificado (Anderson, 1946) que se complementó con 5 g l⁻¹ de extracto de levadura, 10 g l⁻¹ de MOPS y 10 g l⁻¹ de glucosa y se ajustó a pH 6,8.

Se cultivaron 25 ml de precultivo a 37°C durante 15 horas en un medio mixto (medio LB al 10% (Sigma 25%) con 2,5 g l⁻¹ de glucosa y 90% de medio mínimo tal como se ha indicado anteriormente). Se utilizó para inocular 50 ml de cultivo hasta una DO₆₀₀ de 0,3 en medio mínimo modificado.

En caso necesario, se añadieron antibióticos a concentraciones de 50 mg l⁻¹ para la canamicina y la espectinomicina y de 10 mg l⁻¹ para la gentamicina. La temperatura de los cultivos era de 37°C y se fijó la agitación en 200 RPM. Tras alcanzar el cultivo una DO₆₀₀ de 5 a 6, se analizaron los metabolitos extracelulares mediante HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa). Se determinó la producción de BDO mediante CL-EM/EM.

Tabla 2: título de BDO para las cepas 1 y 7 bajo condiciones aeróbicas. Para cada cepa se realizaron dos repeticiones.

Cepa	[BDO] (mg l ⁻¹)
1	No detectado
7	41

Tal como puede observarse en la tabla 2, se incrementó la producción de BDO con la sobreexpresión de *ILV6*, *budC* y *alsS*.

Rutas 2 y 4

Se evaluaron las cepas de producción en matraces pequeños utilizando medio MAC modificado que se había complementado con 10 g l⁻¹ de glucosa y se ajustó el pH a 6,8.

Se cultivó un precultivo de 25 ml a 37°C durante 15 horas en un medio mixto (medio LB al 10% (Sigma 25%) con 2,5 g l⁻¹ de glucosa y 90% de medio M9 (Anderson, 1946). Se utilizó para inocular un cultivo de 50 ml hasta una DO₆₀₀ de 0,3 en medio MAC. La composición de este medio era, por g de litro, de: glicerol: 20,0; triptona: 10,0; NaCl⁺: 5,0; NaNO₃: 0,085; extracto de levadura: 5,0; K₂HPO₄: 0,5; FeSO₄·7H₂O: 0,05; HEPES: 23,0 y NTA: 0,2.

En caso necesario, se añadieron antibióticos a concentraciones de 50 mg l⁻¹ para la canamicina y la espectinomicina, de 30 mg l⁻¹ para el cloranfenicol y de 10 mg l⁻¹ para la gentamicina. La temperatura de los cultivos es de 37°C, y se fijó la agitación a 200 RPM. Se aplicaron condiciones microaeróbicas al cultivo

mediante el sellado de los matraces con tapones de goma. Tras 7 horas, se analizaron los metabolitos extracelulares mediante HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa). Se determinó la producción de BDO mediante CL-EM/EM. Se evaluó dos veces cada cepa.

5 Tabla 3: título de BDO para las cepas 1, 4 y 9 bajo condiciones microaeróbicas para la ruta 4

Cepa	[BDO] (mg l ⁻¹)
1	0
9	118
4	111

Tabla 4: título de BDO para las cepas 1, 4 y 5 bajo condiciones microaeróbicas para la ruta 2. Para cada cepa se realizaron dos repeticiones.

10

Cepa	[BDO] (mg l ⁻¹)
1	0
5	257
4	211

La producción de BDO se encontraba incrementada con la sobreexpresión de los genes de la acetolactato sintasa, de la diacetil sintasa y de la butanodiol deshidrogenasa en *E. coli*.

15 Levadura *S. cerevisiae*

Se evaluaron cepas de producción en matraces pequeños. Se cultivaron 7,5 ml de precultivo a 30°C durante 17 horas en medio YPD (10 g l⁻¹ de extracto de levadura, 10 g l⁻¹ de bactopectona y 10 g l⁻¹ de glucosa). Se utilizó para inocular 70 ml de cultivo de medio MM1 para alcanzar una DO₆₀₀ de 0,2. Se preparó medio mineral sintético (MM1) de la manera siguiente (todas las concentraciones se expresan en g l⁻¹): glucosa: 10,0; (NH₄)₂SO₄: 11,0; KH₂PO₄: 5,5; MgSO₄·7H₂O: 0,9; EDTA·2Na·2H₂O: 0,0300; ZnSO₄·7H₂O: 0,0090; CoCl₂·6H₂O: 0,0006; MnCl₂·4H₂O: 0,0020; CuSO₄·5H₂O: 0,0006; FeSO₄·7H₂O: 0,0060; Na₂MoSO₄·2H₂O: 0,0080; H₃BO₃: 0,0020; CaCl₂·2H₂O: 0,0090; biotina: 0,0020; pantotenato de calcio: 0,0020; ácido nicotínico: 0,0020; mioinositol: 0,0050; hidrocloreuro de tiamina: 0,0020; ácido para-aminobenzoico: 0,0004 y piridoxina: 0,0020.

25

En caso necesario, se añadía leucina a una concentración final de 0,44 mM al medio.

Se mantuvo la temperatura del cultivo a 30°C y bajo agitación a 200 RPM. Se cultivaron las levaduras bajo condiciones aeróbicas, microaeróbicas y anaeróbicas. Se aplicaron condiciones microaeróbicas al cultivo mediante sellado de los matraces con tapones de goma. Para las condiciones anaeróbicas, se complementaron 70 ml de medio mínimo con 0,42 g l⁻¹ de Tween 80 y 0,04 g l⁻¹ de colesterol. Las botellas se purgaron con gas nitrógeno puro durante 15 minutos para establecer condiciones anaeróbicas. Tras aproximadamente 45 horas, se cuantificó la BDO mediante CL-EM/EM y se analizaron otros metabolitos relevantes mediante HPLC con detección refractométrica (ácidos orgánicos y glucosa).

35

Con las cepas 13 y 14, la producción de BDO resultó eficaz para todas las condiciones evaluadas. Las concentraciones finales se encontraban comprendidas entre 80 y 130 mg l⁻¹ para las condiciones anaeróbicas y entre 187 y 234 mg l⁻¹ para las condiciones aeróbicas. Los rendimientos obtenidos bajo condiciones microaeróbicas se presentan en la tabla 5.

40

Tabla 5: títulos de BDO y etanol para las cepas 10, 13 y 14 bajo condiciones microaeróbicas. Para cada cepa se realizaron dos repeticiones.

Cepa	BDO (mg l ⁻¹)	Etanol (g l ⁻¹)
10	6	3,9
13	307	0,3
14	341	0,5

45 Tal como puede observarse en la tabla 5, se incrementó la producción de BDO con la sobreexpresión de las dos rutas introducidas en *S. cerevisiae*.

Referencias

Referencias de patentes

50 Documento WO2011041426

Documento WO2010151525
Documento WO2004076659

Referencias no de patentes

- 5
- Altschul SF (1993), *J Mol Evol.* 36(3):290-300.
 - Anderson EH (1946), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128.
 - Bassit N, Boquien CY, Picque D, Corrieu G. (1993), *Appl Environ Microbiol.* 59(6):1893-7.
 - Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C. (1993), *Nucleic Acids Res.* 21(14):3329-3330
 - 10 - Brat D, Weber C, Lorenzen W, Bode HB, Boles E. (2012), *Biotechnology for Biofuels.* 5:65-80.
 - Boles E, Hollenberg CP. (1997) *FEMS Microbiol Rev.* 21(1):85-111.
 - Celinska E, Grajek W. (2009), *Biotechnol Adv.* 27(6):715-25.
 - Danner H, Braun R. (1999), *Chem. Soc. Rev.*, 28:395-405.
 - 15 - Datsenko KA, Wanner BL (2000), *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 6640-6645.
 - Ehsani M, Fernández MR, Biosca JA, Julien A, Dequin S. (2009), *Appl Environ Microbiol.* 75(10):3196-205.
 - Garg SK, Jain A. (1995), *Bioresour Technol.* 51:103-109.
 - Gietz RD, Woods RA. (2002), *Methods Enzymol.* 350:87-96.
 - 20 - Gietz RD, Schiestl RH. (2007), *Nat. Protoc.* 2:31-34.
 - González E, Fernández MR, Marco D, Calam E, Sumoy L, Pares X, Dequin S, Biosca JA. (2010), *Appl Environ Microbiol.* 76(3):670-9.
 - Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. (1996), *Nucleic Acids Res.* 24(13):2519-24.
 - Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH. (2002), *Nucleic Acids Res.* 30(6):e23.
 - 25 - Guthrie & Fink, (2004) *Methods in Enzymology*, Volume 194, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology (Part A)*, 2004, Christine Guthrie and Gerald R. Fink (Eds), Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
 - Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Jeppsson M, Gorwa-Grauslund MF. (2007), *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 108:147-77.
 - 30 - Hamacher T, Becker J, Gárdonyi M, Hahn-Hägerdal B, Boles E. (2002), *Microbiology.* 148(Pt 9):2783-8.
 - Hasty et al. (1991), *Mol Cell Biol* 11:5586-91.
 - Hatti-Kaul R, Törnvall U, Gustafsson L, Börjesson P. (2007), *Trends Biotechnol.* 25(3):119-24.
 - Jin YS, Jeffries TW. (2004), *Metab Eng.* 6(3):229-38.
 - Jin YS, Laplaza JM, Jeffries TW. (2004), *Appl Environ Microbiol.* 70(11):6816-25.
 - 35 - Ji XJ, Huang H, Ouyang PK. (2011), *Biotechnol Adv.* 29(3):351-64.
 - Larsson C, Nilsson A, Blomberg A, Gustafsson L. (1997), *J Bacteriol.* 179(23):7243-50.
 - Larsson C, Pålman IL, Gustafsson L. (2000), *Yeast.* 16(9):797-809.
 - Liu M, Sergienko EA, GuoF, Wang J, Tittmann K, Hubner G, Furey W, Jordan F. (2011), *Biochemistry.* 40:7355-7368.
 - 40 - Ma H, Kunes S, Schatz PJ, Botstein D. (1987), *Gene.* 58:201-2016.
 - Magee RJ, Kosaric N. (1985), *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 32:61-93.
 - Miller (1992), *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
 - Nevoigt E, Fischer C, Mucha O, Matthäus F, Stahl U, Stephanopoulos G. (2007), *Biotechnol Bioeng.* 96(3):550-8.
 - 45 - Ng CY, Jung M, Lee J, Oh M. (2012), *Microbial Cell Factories.* 11: 68-81.
 - Nielsen DR, Yoon SH, Yuan CJ, Prather KL. (2010), *Biotechnol J.* 5(3):274-84.
 - Portnoy VA, Scott DA, Lewis NE, Tarasova Y, Osterman AL, Palsson BØ. (2010), *Appl Environ Microbiol.* 76(19):6529-40.
 - 50 - Raymond CK, Pownder TA, Sexson S. (1999), *BioTechniques.* 26:134-141.
 - Romano P, Suzzi G. (1996), *Appl Environ Microbiol.* 62(2):309-15.
 - Romano P, Suzzi G, Brandolini V, Menziani E, Domizio P. (1996), *Lett Appl Microbiol.* 22(4):299-302.
 - Runquist D, Hahn-Hägerdal B, Rådström P. (2010), *Biotechnol Biofuels.* 3:5.
 - Saloheimo A, Rauta J, Stasyk OV, Sibirny AA, Penttilä M, Ruohonen L. (2007), *Appl Microbiol Biotechnol.* 74(5):1041-52.
 - 55 - Sambrook J et al. (1989) (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd & 3rd Editions, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - Schaefer U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz D., (1999), *Anal. Biochem.* 270: 88-96.
 - Sedlak M, Ho NW. (2004), *Yeast.* 21(8):671-84.
 - 60 - Smidt O, Preez JC, Albertyn J. (2012), *FEMS Yeast Res.* 12(1):33-47.
 - Sunderland, MA., or Deshpande, Mukund V. (1992), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36:227.
 - Syu MJ. (2001), *Appl Microbiol Biotechnol.* 55(1):10-8.
 - Takasaki K, Shoun H, Yamaguchi M, Takeo K, Nakamura A, Hoshino T, Takaya N. (2004), *J Biol Chem.*

279(13):12414-20.

- Ui S, Takusagawa Y, Sato T, Ohtsuki T, Mimura A, Ohkuma M, Kudo T. (2004), Lett Appl Microbiol. 39(6):533-7.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P. (1994), Yeast. 10:1793-1808.
- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E. (1999), FEBS Lett. 464(3): 123-8.
- Wu KJ, Saratale GD, Lo YC, Chen WM, Tseng ZJ, Chang MC, Tsai BC, Su A, Chang JS. (2008), Bioresour Technol. 99(17):7966-70.
- Zhou Z, Takaya N, Nakamura A, Yamaguchi M, Takeo K, Shoun H. (2002), J Biol Chem. 277(3):1892-6.

Listado de secuencias

<110> EXPLORADOR METABÓLICO

<120> CEPAS DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL

<130> 361606

<150> EP11190018.9

<151> 2011-11-21

<150> US61/562,136

<151> 2011-11-21

<160> 56

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 99

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 1

ccttagccag tttgttttcg ccagttcgat cacttcatca ccgctccgc tgatgattgc 60

gcgcagcata tacaggctgc atatgaatat cctccttag 99

<210> 2

<211> 102

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 2

cggttgagc ttatatcgcc aaaacactcg aatcggcagg ggtgaaacgc atctggggag 60

tcacaggcga ctctctgaac ggtgtaggct ggagctgctt cg 102

<210> 3

<211> 101

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 3

ttaaaccagt tcggtcgggc aggtttcgcc tttttccaga ttgcttaagt tttgcagcgt 60

agtctgagaa atactggtca gcatatgaat atcctcctta g 101

ES 2 646 422 T3

<210> 4
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5

 <220>
 <223> Oligonucleótido
 10
 <400> 4
 gaaactcgcc gtttatagca caaaacagta cgacaagaag tacctgcaac aggtgaacga 60
 gtcctttggc tttgagctgg tgtaggctgg agctgcttcg 100

 <210> 5
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15

 <220>
 <223> Oligonucleótido
 20
 <400> 5
 cgagtaagtt agtactgggt ctgaactgcg gtagttcttc actgaaattt gccatcatcg 60
 atgcagtaaa tgggtgaagag tgtaggctgg agctgcttcg 100

 <210> 6
 <211> 97
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> Oligonucleótido
 30
 <400> 6
 gctgctgtgc agactgaatc gcagtcagcg cgatgggtgta gacgatatcg tcaaccagtg 60
 cgccacggga caggtcgcat atgaatatcc tccttag 97

 <210> 7
 <211> 104
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

 <220>
 <223> Oligonucleótido
 40
 <400> 7
 cgggagctcg agctgttgac aattaatcat cgggctcgta taatgtgtgg aagtcgacgt 60
 taaccctagg taaggaggtt ataaatgtct gaaattactt tggg 104
 45

 <210> 8
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50

 <220>
 <223> Oligonucleótido
 55
 <400> 8
 cgcggatccg cggctagctt attgcttagc gttgtag 38

 <210> 9
 <211> 107

ES 2 646 422 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 9		
	cgggagctcg agctgttgac aattaatcat cgggctcgta taatgtgtgg aagtcgacgt		60
	taaccctagg taaggaggtt ataaatgaaa aaagtcgcac ttgttac		107
10	<210> 10		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 10		
20	gctctagatt agttaaacac catcccgc	28	
	<210> 11		
	<211> 86		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 11		
	ggactagtga gctgttgaca ataatcatc cgggctcgat aatgtgtgga ataaggaggt		60
30	tataaatgtc cgagcttaat gaaaag		86
	<210> 12		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
40	<400> 12		
	cggaattctt acatagattg agtgaagg	28	
	<210> 13		
	<211> 100		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
50	<400> 13		
	atctatgtaa gaattcgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat		60
	aaggaggtta taaatgagta agcgtaaagt cgccattatc		100
	<210> 14		
	<211> 68		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
60	<223> Oligonucleótido		

ES 2 646 422 T3

	<400> 14		
	aaaagctggg taccgggccc gcagaaaggc ccacccgaag gtgagccagt catgccgctt	60	
	ctcctgcc	68	
5	<210> 15 <211> 103 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido		
	<400> 15		
	ctaaacgtag aacctgtctt attgagcttt cgggcgagag ttcaatgggt cacactggct	60	
15	caccttcggg tgggcctttc tgccatatga atatcctcct tag	103	
	<210> 16 <211> 121 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido		
	<400> 16		
	cgttctgaca tgggttattc cttatctatc taataacggt gagttttctg gaacctgttt	60	
	ccacacagta tacgagccgg atgattaatc gacaacagct ctgtaggctg gagctgcttc	120	
25	g	121	
	<210> 17 <211> 85 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Oligonucleótido		
35	<400> 17		
	cgggatccga gctggtgaca attaatcatc cggctcgtat aatgtgtgga ataaggaggt	60	
	tataaatgga taaacagtat ccggt	85	
	<210> 18 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> Oligonucleótido		
45	<400> 18		
	cggaattcgc agaaaggccc acccgaaggt gagccagtta cagaatctgt gacagat	57	
	<210> 19 <211> 108 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Oligonucleótido		
55	<400> 19		

ES 2 646 422 T3

cgggagctcg agctgttgac aattaatcat ccggctcgta taatgtgtgg aagtcgacgt 60
 taaccctagg taaggaggtt ataaatgctg cgtagcctgc tgcaaagc 108
 <210> 20
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 20
 gcggtaccgc agaaaggccc acccgaagggt gagccagtta acccggaggc agctggct 58
 <210> 21
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 21
 gaatcgcgacc aataactgac atttataacc tccttaggat ccgtcgcactt ccacacatta 60
 tacgagccgg atgattaatt gtcaacagct ccatatgaat atcctcctta g 111
 <210> 22
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 22
 ctatctatac tttaaggtga ctgccaaaac agactcgcag tagccttcga gctgcgcacc 60
 aacacggcct cagatgggcc acatctggag aaacaccgca tgtaggctgg agctgcttcg 120
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 23
 gtcagttatt gtcgcattc 20
 <210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 24
 ctcgtcgttc atctgttg 19
 <210> 25
 <211> 26
 <212> ADN

ES 2 646 422 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 5
 <400> 25
 gctatctata cttaagggtg actgcc 26
 <210> 26
 <211> 115
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 15
 <400> 26
 atctatgtaa gaattcgcta gcgagctggt gacaattaat catccggctc gtataatgtg 60
 tgaagaacc ctaaatagaa ggaggcgcac aaaatgaaat tgtaaaacg agaag 115
 20
 <210> 27
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 27
 cggtatcgat aagcttgcag aaaggccac ccgaaggtga gccagtacgt attaattcaa 60
 30
 tgccggctcg c 71
 <210> 28
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 40
 <400> 28
 tcaagctata ccaagcatac aatcaactat ctcatataca gcataggcca ctagtggatc 60
 tg 62
 <210> 29
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 50
 <400> 29
 cttatthaat aataaaaatc ataatcata agaaattcgc ccagctgaag ctcgtacgc 60
 55
 <210> 30
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Oligonucleótido

ES 2 646 422 T3

<400> 30
 gttaaaacta ggaatagtat agtcataagt taacaccatc gcataggcca ctagtggatc 60
 tg 62
 5
 <210> 31
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 31
 acaaagactt tcataaaaag tttgggtgcg taacacgcta ccagctgaag ctcgtacgc 60
 15
 <210> 32
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 32
 aagaaaatta ttttaactaca tatctacaaa atcaaagcat gcataggcca ctagtggatc 60
 tg 62
 25
 <210> 33
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 33
 taaaaagtaa aaatatattc atcaaattcg ttacaaaaga ccagctgaag ctcgtacgc 60
 <210> 34
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 45
 <400> 34
 ctaaaccctt tgagctaaga ggagataaat acaacagaat caattttcaa ttcgtacgct 60
 gcaggtcgac 70
 <210> 35
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 55
 <400> 35
 gtctgcattt tttactgaaa atgcttttga aataaatgtt tttgaaatgc ataggccact 60
 agtggatctg 70

ES 2 646 422 T3

<210> 36
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 36
 gaataaacac aaaaacaaaa agttttttta attttaatca aaaaatgaga gctttggcat 60
 10 atttc 65
 <210> 37
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 20 <400> 37
 cggatgtggg gggagggcgt gaatgtaagc gtgacataac taatcttact tcatttcacc 60
 gtgattg 67
 <210> 38
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 30 <400> 38
 agaataaaca caaaaacaaa aagttttttt aattttaatc aaaaatgag taagcgtaaa 60
 gtcgccatta tcg 73
 <210> 39
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 40 <400> 39
 gagggcgtga atgtaagcgt gacataacta attacatgac tcgagtcatg ccgcttctcc 60
 tgctt 65
 <210> 40
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 50 <400> 40
 gaataaacac aaaaacaaaa agttttttta attttaatca aaaaatgtc agttattggt 60
 cgcattc 67
 55 <210> 41
 <211> 65

ES 2 646 422 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 41		
	gagggcgtga atgtaagcgt gacataacta atacatgac tcgagttaga acattacctt	60	
	atgac	65	
10	<210> 42		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 42		
	tcaaggaagt aattatctac tttttacaac aaatataaaa caatgtccga gcttaatgaa	60	
	aag	63	
20	<210> 43		
	<211> 66		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 43		
	aatgcttata aaactttaac taataattag agattaaatc gcttacaatg attgagtgaa	60	
30	ggtacg	66	
	<210> 44		
	<211> 27		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
40	<400> 44		
	aattagttat gtcacgctta cattcac 27		
45	<210> 45		
	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
50	<400> 45		
	ggttttttca gttttgttct ttttgcaaac agcggccgcc taaggggcca attgggtacc	60	
	ggccg	65	
55	<210> 46		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 646 422 T3

<220>
<223> Oligonucleótido

5 <400> 46
taagcgattt aatctctaat tattagtaa ag 32

10 <210> 47
<211> 68
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 47
ctatgCGGgtg tgaaataccg cacagatgCG taaggagaaa atacctgttc cttaatcaag 60
gatacctc 68

20 <210> 48
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 48
ccttagcgg cgcgtgttg caaaaagaac aaaactg 37

30 <210> 49
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 49
cattgttta tattgtgtg aaaaagtaga taattac 37

40 <210> 50
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 50
gaataaacac aaaaacaaaa agttttttta attttaatca aaaaaatgaa attgttaaaa 60
cgagaaggc 69

50 <210> 51
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 51
cggatgtggg gggagggcgt gaatgtaagc gtgacataac taattttaca ttcctccttt 60

60 ttcatatgac 70

ES 2 646 422 T3

5	<p><210> 52 <211> 62 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Oligonucleótido</p>	
10	<p><400> 52 catcaaggaa gtaattatct actttttaca acaaatataa aacaatggcg agagtcataa</p>	60
	gc	62
15	<p><210> 53 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Oligonucleótido</p>	
20	<p><400> 53 cataaaaatg cttataaaac tttactaat aattagagat taaatcgctt aattcaatgc</p>	60
	cggtc	66
25	<p><210> 54 <211> 771 <212> ADN <213> Klebsiella pneumoniae</p>	
	<p><400> 54 atgaaaaaag tcgcacttgt taccggcgcc gccagggga ttggtaaagc tatcgccctt</p>	60
	cgtctggtga aggatggatt tgccgtggcc attgccgatt ataacgacac caccgcaaaa	120
	gcggtcgcct ccgaaatcaa ccaggccggc gcccgcgcca tggcggtgaa agtggatgtc	180
	tccgaccgcg atcaggtggt tgccgccgct gaacaggcgc gcaaaacgct gggcggcttc	240
	gacgtcatcg tcaacaacgc cggcgtggcg ccgtccacgc cgatcgagtc cattaccccg	300
	gagattgtcg ataaagtcta caacatcaac gttaaagggg tgatctgggg cattcaggcg	360
	gcggtcagag cctttaagaa agagggtcac ggcgggaaaa tcatcaacgc ctgttcccag	420
	gccggccacg tcggcaacc ccgagctggcg gtatatagct cgagtaaatt ccggtacgc	480
30	ggcttaacc agaccgcgc tcgcgacctc gcgccgctgg gcatcacagt caacggctac	540
	tgcccgggga ttgtcaaaac gccaatgtgg gccgaaattg accgccaggt gtccgaagcc	600
	gccggtaaac cgctgggta cgtaccgcc gagttcgcca aacgcatcac cctcggccgc	660
	ctgtccgagc cggaagatgt cgcgcctgc gtctcctatc ttgccagccc ggattctgat	720
	tatatgaccg gtcagtcatt gctgatcgac ggcgggatgg tgtttaacta a	771
35	<p><210> 55 <211> 1680 <212> ADN <213> Klebsiella pneumoniae</p>	
	<400> 55	

ES 2 646 422 T3

atggataaac agtatccggt tcgtcagtgg gcacatggtg cagatctggt tgttagccag 60
 ctggaagcac aggggtgttcg tcagatTTTT ggtattccgg gtgccaaaat cgataaagtt 120
 tttgatagcc tgctggatag cagcattcgt attattccgg tgcgtcatga agcaaatgca 180
 gcatttatgg cagcagcagt tggtcgtatt accggcaaag ccggtgttgc actggttacc 240
 agcgggccgg gttgtagcaa tctgattacc ggtatggcaa ccgcaaatag cgaaggatgat 300
 ccggttgttg ccctgggtgg tgcagttaa cgtgcagata aagcaaaaca ggttcatcag 360
 agcatggata ccgttgcaat gtttagtccg gttaccaaat atgcagttga agttaccgca 420
 ccggatgcac tggccgaagt tgttagcaat gcatttcgtg cagcagaaca gggtcgtccg 480
 ggtagcagct ttgttagcct gccgcaggat gttgtttagt gtccggttag cggtaaagtt 540
 ctgcctgcaa gccgtgcacc gcagatgggt gcagctccgg atgatgcaat tgatcaggtt 600
 gcaaaactga ttgcacaggc caaaaaccgg atttttctgc tgggtctgat ggcaagccag 660
 ccgaaaaata ggcgagcact gcgtcgtctg ctggaagcga gccatattcc ggttacaagc 720
 acctatcagg cagccggtgc cgtaaatcag gataacttta gccgttttgc aggtcgtggt 780
 ggtctgttta ataaccaggc aggggatcgc ctgctgcaac tggccgatct ggttatttgt 840
 attggttatt ctccggtgga atatgaaccg gcaatgtgga atagcggtaa tgcaaccctg 900
 gtgcatattg atgttctgcc agcctatgaa gaacgtaatt atacaccgga tgttgaactg 960
 gtgggtgata ttgcaggcac cctgaataaa ctggcacaga atattgatca tcgtctggtt 1020
 ctgagtcggc aggcagcaga aattctgcgt gatcgtcagc atcagcgtga actgctggat 1080
 cgtcgtggtg cacagctgaa tcagtttgca ctgcatccgc tgcgtattgt tcgtgcaatg 1140
 caggatattg ttaatagtga tgttaccctg accgttgata tgggcagctt tcatatttgg 1200
 attgcccgtt atctgtatag ctttctgca cgtcaggtta tgattagcaa tggtcagcag 1260
 acaatgggtg ttgcgctgcc gtgggcaatt ggtgcatggc tggtaatcc ggaacgtaa 1320
 gttgtgagcg ttagcgggtga tgggtgtttt ctgcaaagca gcatggaact ggaaaccgca 1380
 gttcgtctga aagcaaatgt tctgcatctg atttgggtgg ataatggcta taatatggtg 1440
 gccatccaag aagagaaaa ataccagcgt ctgagcggtg ttgaatttgg tccgatggat 1500
 tttaaagcct atgccgaaag ttttgggtgca aaaggttttg ccggtgaaag cgcagaagca 1560
 ctggaaccga ccctgcgtgc agcaatggat gtggatggtc ctgccgttgt tgcaattccg 1620
 gttgattatc gtgataatcc gctcgtgatg ggtcagctgc atctgtcaca gattctgtaa 1680

5 <210> 56
 <211> 930
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

10 <400> 56

ES 2 646 422 T3

atgctgcgta gcctgctgca aagcggatcat cgtcgtgttg ttgcaagcag ctgtgccaca	60
atggttcgtt gtagcagcag cagtaccagc gcactggcat ataaacaaat gcatcgtcat	120
gcaaccctgc cgcctctgcc gaccctggat accccgagct ggaatgcaaa tagcgcagtt	180
agcagcatta tctatgaaac accggcaccg agccgtcagc ctcgtaaaca gcatgttctg	240
aattgtctgg ttcagaatga accgggtggt ctgagccgtg ttagcggcac cctggcagca	300
cgtggtttta acattgatag cctggttggt tgcaacaccg aagttaaaga tctgagtcgt	360
atgaccattg ttctgcaagg tcaggatggt gttggtgaac aggcacgtcg tcagattgaa	420
gatctggttc cggtttatgc agttctggat tataccaaca gcgaaatcat taaacgtgaa	480
ctggttatgg cacgtattag tctgctgggc accgaatatt ttgaggatct gctgctgcat	540
catcatacca gcaccaatgc cggcgcagca gatagccaag aactggttgc agaaattcgt	600
gaaaaacagt ttcattccggc aaatctgcct gcaagcgaag ttctgcgtct gaaacatgaa	660
catctgaacg atattaccaa cctgaccaat aactttggtg gtcgtgtggt tgatattagc	720
gaaaccagct gtattgttga actgagcgca aaaccgacct gtattagcgc atttctgaaa	780
ctggttgaac cgtttggtgt tctggaatgt gcacgtagcg gtatgatggc actgcctcgt	840
acaccgctga aaaccagcac cgaagaggca gcagatgaag atgaaaaaat cagcgaatt	900
gtggatatca gccagctgcc tccgggttaa	930

REIVINDICACIONES

- 5 1. Microorganismo recombinante genomanipulado para la producción de 2,3-butanodiol (BDO) en el que dicho microorganismo sobreexpresa los enzimas siguientes implicados en la conversión del piruvato en 2,3-butanodiol:
- 10 a) un polipéptido que cataliza la conversión del piruvato en acetil-CoA mediante la sobreexpresión de los genes *pflA* y/o *pflB* que codifican la piruvato formato liasa,
- b) un polipéptido que cataliza la conversión de dicho acetil-CoA en acetaldehído mediante la sobreexpresión del gen *mhpF* que codifica la acetaldehído deshidrogenasa,
- 15 c) un polipéptido que cataliza la condensación de dicho acetaldehído en acetoína mediante la sobreexpresión de un gen seleccionado de entre *PDC1*, *PDC5* y *PDC6* que codifica la piruvato descarboxilasa, y
- d) una butanodiol deshidrogenasa (BDH) que cataliza la conversión de dicha acetoína en 2,3-butanodiol.
2. Microorganismo recombinante según la reivindicación 1, en el que la BDH es codificada por *budC* de *Klebsiella pneumoniae*, *BDH1* de *Saccharomyces cerevisiae*, o *BDH2* de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 20 3. Microorganismo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la célula se modifica además para sobreexpresar por lo menos un gen que codifica: aldosa reductasa, xilitol deshidrogenasa, xilulocinasa, L-arabinol-4-deshidrogenasa, L-xilulosa reductasa, transportador de hexosa y transportador de galactosa.
- 25 4. Microorganismo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho microorganismo se selecciona de entre especies de *Saccharomycetaceae* o especies de *Enterobacteriaceae*.
5. Procedimiento de producción de 2,3-butanodiol (BDO) que comprende las etapas siguientes:
- 30 - proporcionar un microorganismo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
- cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono, y
- recuperar el 2,3-butanodiol

Figura 1

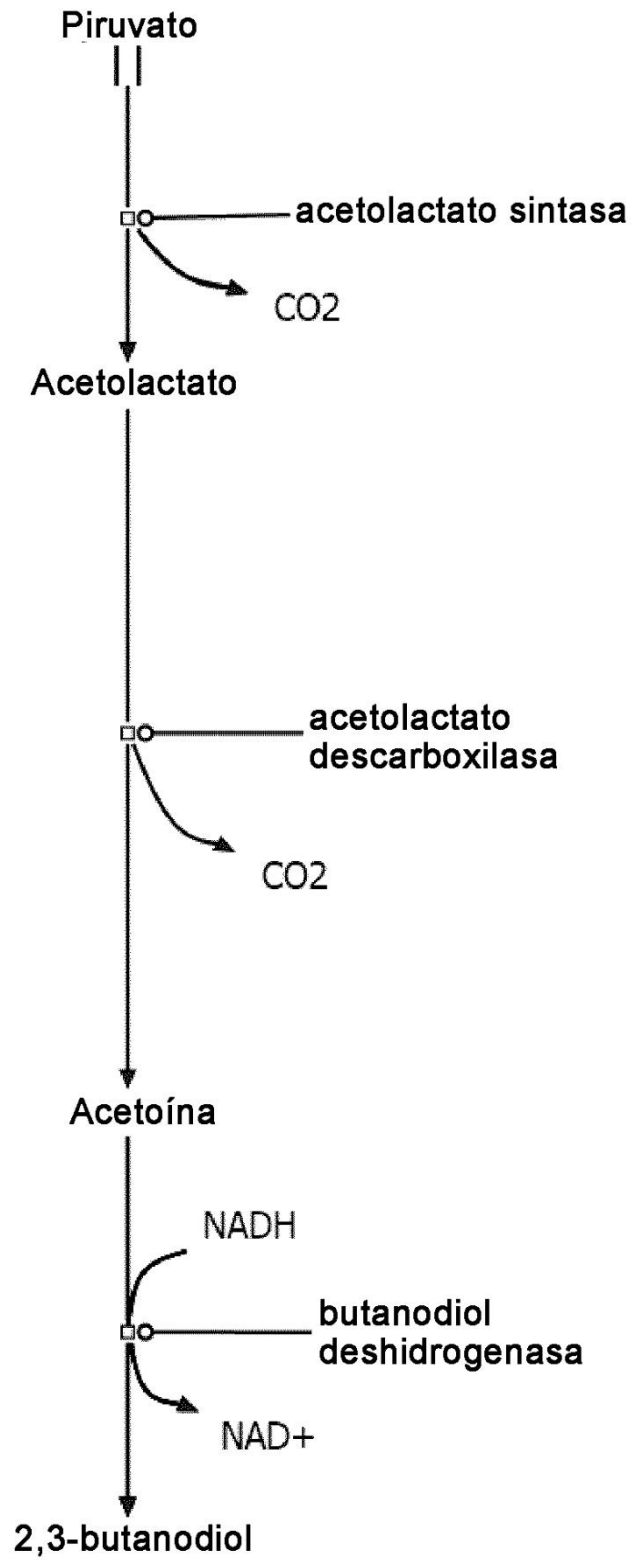


Figura 2

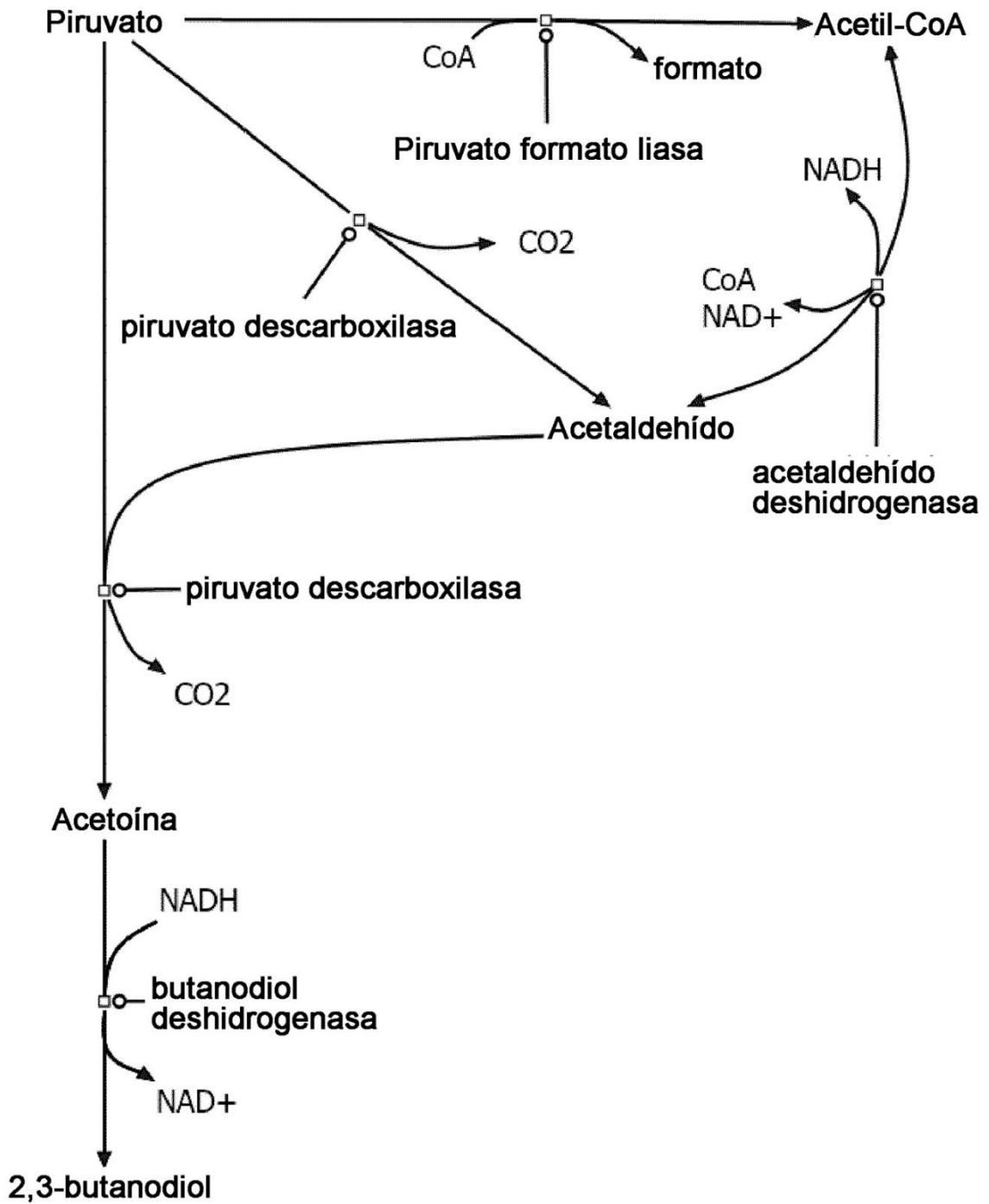


Figura 3

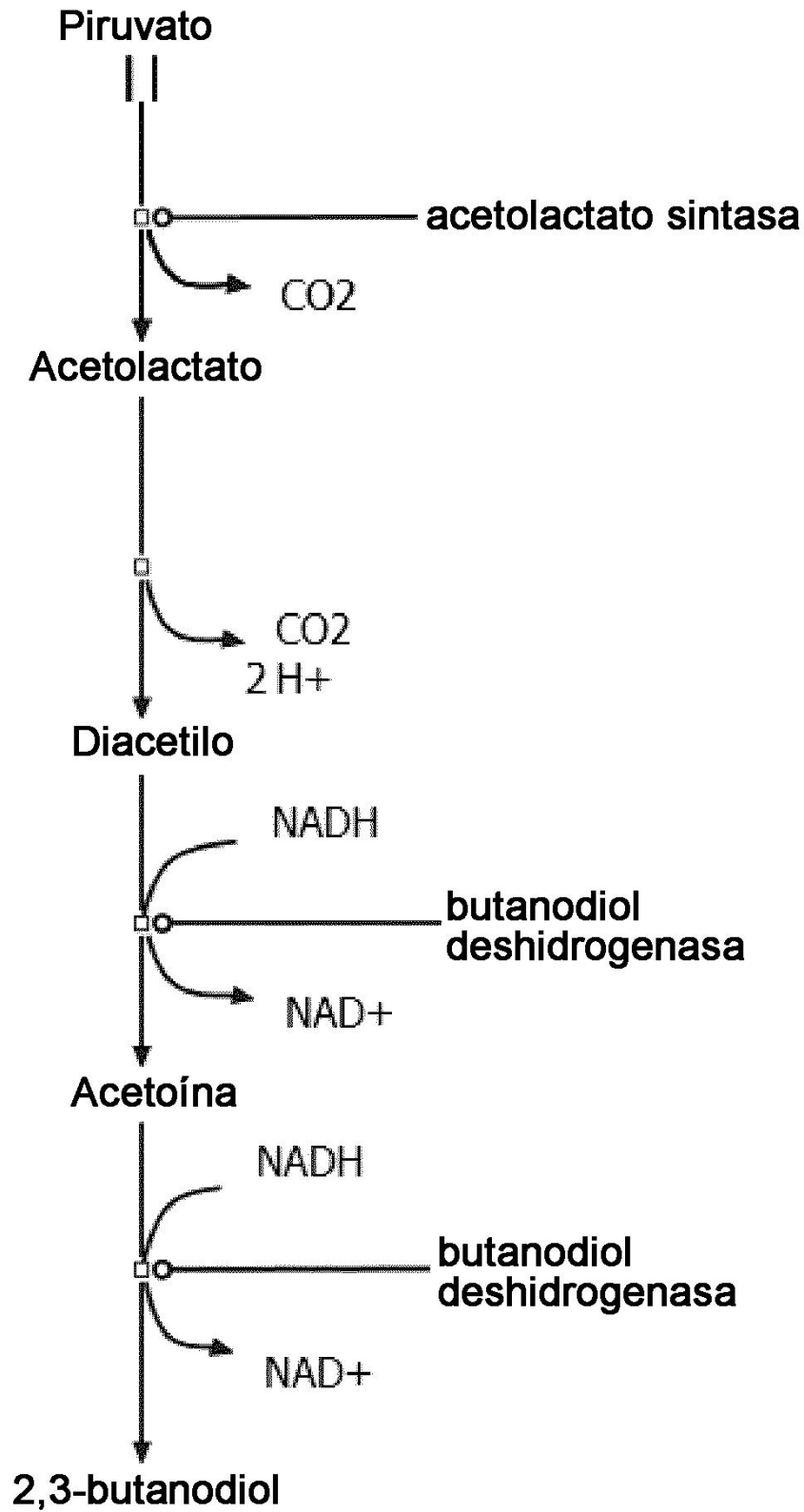


Figura 4

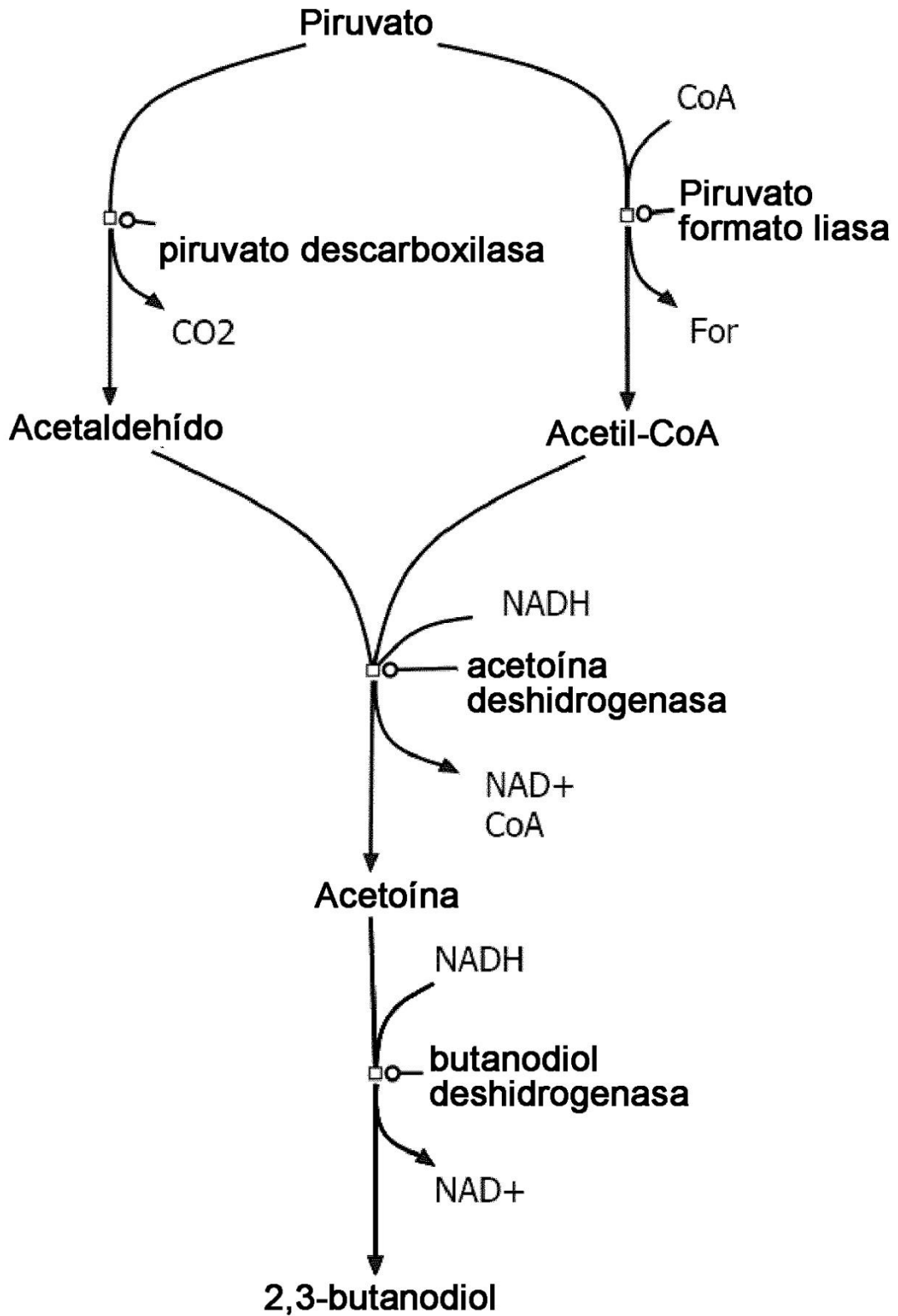


Figura 5

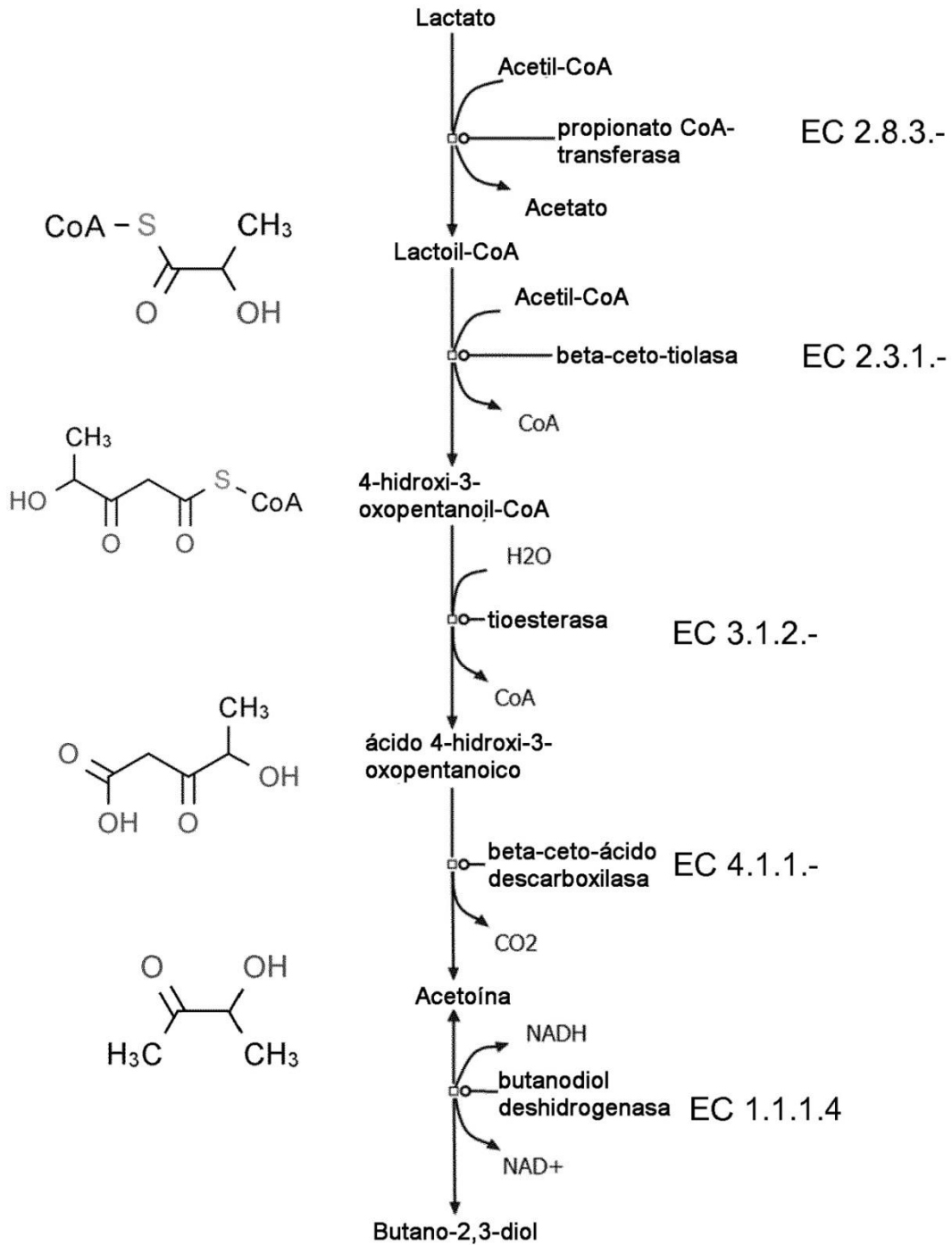


Figura 6

