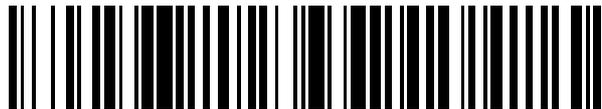


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 953**

51 Int. Cl.:

C12P 3/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2013 PCT/NZ2013/000087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13176556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2013 E 13793326 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2852673**

54 Título: **Método de selección y microorganismos recombinantes y usos para los mismos**

30 Prioridad:

23.05.2012 US 201261650757 P

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

04.04.2018

73 Titular/es:

**LANZATECH NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)
24 Balfour Road Parnell
Auckland 1052, NZ**

72 Inventor/es:

**KOEPKE, MICHAEL y
AL-SINAWI, BAKIR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 661 953 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

Método de selección y microorganismos recombinantes y usos para los mismos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a microorganismos recombinantes, a métodos para la producción de uno o más productos mediante fermentación, y a métodos de selección.

Antecedentes de la invención

10 Los marcadores y agentes seleccionables (o selectivos) son importantes para modificar genéticamente células o microorganismos. Se pueden usar para cribar células a las que se ha introducido ADN. Un marcador seleccionable protege al organismo frente a la presencia o la ausencia de un agente selectivo que normalmente lo mataría o evitaría su crecimiento. Habitualmente se usan genes de resistencia a antibióticos como marcadores seleccionables, y el respectivo antibiótico como agente selectivo.

15 El uso de agentes seleccionables como los antibióticos añade unos costes significativos a un proceso como el de una fermentación industrial. Algunos antibióticos también son poco o nada solubles en agua y necesitan ser disueltos en disolventes. Esto añade costes adicionales y potencialmente tiene un efecto negativo sobre las células microbianas; por ejemplo, es necesario disolver el cloranfenicol y el tianfenicol en etanol o dimetilformamida (DMF), respectivamente.

20 Algunos organismos también son resistentes de forma natural a algunos antibióticos y por tanto no pueden ser usados como agentes seleccionables. Por ejemplo, la mayoría de las clases de antibióticos solo son activas contra bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, ya que atacan componentes de la pared celular y varios géneros presentan resistencia natural contra antibióticos específicos (por ejemplo, *Clostridia* contra cloranfenicol, ya que poseen genes de cloranfenicol acetiltransferasa que confieren resistencia y que también son capaces de reducir el residuo aril-nitro de la molécula para inactivarla (O'Brien & Morris, 1971, J Gen Microbiol, 67: 265-271)

25 Adicionalmente, algunas sustancias antibióticas son desactivadas o no pueden usarse en las condiciones de proceso típicas. Por ejemplo, el pH bajo de entre 4-5,5 usado en varios procesos de fermentación inactiva la macrolida eritromicina, mientras que por otro lado su análogo claritromicina solo se disuelve a un pH extremadamente bajo por debajo de 2 (Mermelstein & Papoutsakis, 1993, FEMS Microbiol Lett, 113: 71-76).

Los marcadores auxotróficos que pueden compensar una incapacidad para metabolizar determinados aminoácidos, nucleótidos o azúcares, también se pueden usar para la selección. Sin embargo, éstos también requieren la adición de compuestos al medio que por otra parte no serían necesarios, incrementado los costes.

30 También se han usado genes indicadores para permitir la selección de transformantes exitosos durante procesos para producir microorganismos recombinantes; por ejemplo, genes que codifican proteína fluorescente verde o beta-galactosidasa (*lacZ*). Sin embargo, éstos pueden ser tóxicos para las células y los productos producidos no deseados en reacciones de fermentación comerciales.

35 Un objetivo de la invención es solventar una o más de las desventajas de la técnica anterior, o al menos proporcionar al público con una elección útil.

40 La técnica anterior consiste en el documento Kong et al (Cell Research, 18: 566-57) dirigido a AtTHIC, un gen implicado en la biosíntesis de tiamina en *Arabidopsis thaliana*; la patente US 2002/127670 A1 dirigida a genes de riboflavina sintasa y a enzimas y métodos de uso; la patente WO 2008/131359 A1 dirigida a células biológicas modificadas genéticamente; el documento Serebriiskii et al (Gene, 175: 15-22) dirigido a dos nuevos miembros de la superfamilia BioB que incluye la clonación, el secuenciamiento y la expresión de genes bioB de *Methylobacillus flagellatum* y *Corynebacterium glutamicum*; el documento Ohsawa et al (Gene, 80: 39-48) dirigido a la clonación del gen de biotina sintasa de *Bacillus sphaericus* y a la expresión en *Escherichia coli* y *Bacilos*; el documento Gloeckler et al (Gene, 87: 63-70) dirigido a la clonación y caracterización de los genes de *Bacillus sphaericus* que controlan la bioconversión de pimelato en detiobiotina; y el documento Kopke et al (Applied and Environmental Microbiology, 77: 5467-5475) dirigido a la producción de 2,3-butanodiol 5-8 mediante bacterias acetogénicas, que proporciona una ruta alternativa a la síntesis química usando gas residual industrial.

Sumario de la invención

50 La invención generalmente proporciona, entre otros, métodos para la producción de uno o más productos mediante fermentación microbiana de un sustrato, microorganismos modificados genéticamente de uso en dichos métodos, ácidos nucleicos adecuados para la preparación de microorganismos modificados genéticamente, y métodos para la selección de determinados microorganismos en una población mixta de microorganismos o la prevención del crecimiento de microorganismos no deseados.

En un primer aspecto, la invención proporciona una bacteria acetogénica carboxidotrófica diseñada genéticamente que es prototrófica para tiamina, en virtud a un gen *thiC* heterólogo, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum* y *Clostridium ljungdahlii*.

5 En un segundo aspecto, la invención proporciona la bacteria según el primer aspecto, en donde la bacteria es prototrófica para tiamina y pantotenato, en virtud a un gen *thiC* heterólogo y un grupo de genes *panBCD* heterólogos.

En un tercer aspecto, la invención proporciona la bacteria según el segundo aspecto, en donde el grupo de genes *panBCD* heterólogos procede de *Clostridium beijerinckii*.

10 En un cuarto aspecto, la invención proporciona la bacteria según el primer aspecto, que comprende crecer la bacteria en un medio que comprende una fuente de carbono gaseosa, en donde la fuente de carbono comprende CO, y en donde el medio está desprovisto de tiamina.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para cultivar la bacteria según el segundo aspecto, que comprende crecer la bacteria en un medio que comprende una fuente de carbono gaseosa, en donde la fuente de carbono comprende CO, y en donde el medio está desprovisto de pantotenato.

15 En un sexto aspecto, la invención proporciona un método para cultivar la bacteria según el primer aspecto, que comprende crecer la bacteria en un medio que comprende una fuente de carbono gaseosa, en donde la fuente de carbono comprende CO, y además en donde dicha fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en gases de escape de automóviles, gas residual de la fabricación de productos metálicos férreos, gas residual de la fabricación de productos no férreos, gas residual de procesos de refinado de petróleo, gas residual de la gasificación de carbón, gas residual de la producción de electricidad, gas residual de la producción de negro de humo, gas residual de la producción de amoníaco, gas residual de la producción de metanol, gas residual de la producción de coque, y gas de síntesis.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un método según el sexto aspecto, en donde la fuente de carbono comprende gas residual de acería.

25 **Microbios y su crecimiento**

Se contemplan bacterias acetogénicas, carboxidotróficas, modificadas genéticamente, aisladas. Éstas pueden ser prototróficas para tiamina, pantogenato, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, biotina, ácido fólico y/o cianocobalamina en virtud a un gen biosintético exógeno en la ruta biosintética correspondiente a la vitamina. Por ejemplo, se puede usar un gen *thiC* exógeno y/o un grupo de genes *panBCD* exógenos para convertir un auxótrofo en un protótrofo. Las bacterias pueden ser *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii* o *Thermoanaerobacter kiuvi*. Opcionalmente, la bacteria es incapaz de convertir 1-(5'-fosforibosil)-5-aminoimidazol ribonucleótido (AIR) en 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina en ausencia de dicho gen *thiC* exógeno. Se contempla un gen *thiC* exógeno procedente de *C. ragsdalei* y se incluye más adelante como ejemplo. El gen *thiC* exógeno puede estar en un plásmido, de tal forma que la bacteria es auxotrófica para tiamina cuando se cura de un plásmido. Alternativamente, se contempla que la bacteria sea auxotrófica para pantotenato cuando se cura de un plásmido. En determinadas realizaciones, se contemplan bacterias carboxidotróficas, modificadas genéticamente, aisladas. Las bacterias pueden ser *C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. phytofermentans*, *C. thermocellum*, *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum*.

Un grupo de genes *panBCD* exógenos particular que puede usarse es el procedente de *C. beijerinckii*.

45 Las bacterias acetogénicas carboxidotróficas modificadas genéticamente pueden cultivarse creciéndolas en un medio que comprende una fuente de carbono gaseosa; la fuente de carbono puede comprender CO. De forma similar, las bacterias pueden cultivarse en un medio que comprende una fuente de energía que comprende CO. Se contempla que el cultivo puede ser estrictamente anaerobio. También se contempla que si la bacteria comprende un gen *thiC* exógeno que el medio puede estar desprovisto de tiamina. En algunas realizaciones, la bacteria comprenderá un grupo de genes *panBCD* exógenos y el medio estará desprovisto de pantotenato. En otras realizaciones, la bacteria comprenderá uno o más genes exógenos en una ruta biosintética y el medio estará desprovisto del producto de la correspondiente ruta biosintética. En algunas realizaciones, la fuente de carbono puede comprender una corriente gaseosa residual, tal como gas residual de la fabricación de productos metálicos férreos tal como gas residual de acería; gas residual de la fabricación de productos no férreos, gas residual de procesos de refinado de petróleo, gas residual de la gasificación de carbón, gas residual de la producción de electricidad, gas residual de la producción de negro de humo, gas residual de la producción de amoníaco, gas residual de la producción de metanol, gas residual de la producción de coque, y gas de síntesis. También se pueden usar los gases de escape de automóviles como fuente de carbono.

Procesos de conversión de CO

Una realización contemplada es un proceso para convertir el CO de un sustrato que contiene CO en productos de mayor peso molecular. El proceso comprende hacer pasar el sustrato que contiene CO a un biorreactor que contiene un cultivo de bacterias acetogénicas carboxidotróficas en un medio de cultivo tal que las bacterias conviertan el CO en productos de mayor peso molecular; y recuperar los productos de mayor peso molecular del biorreactor. Las bacterias acetogénicas carboxidotróficas son modificadas genéticamente para expresar una enzima de una ruta biosintética de un nutriente que está ausente del medio de cultivo. Se pueden proporcionar nutrientes añadidos opcionalmente al medio de cultivo para supervivencia y/o crecimiento de las bacterias acetogénicas carboxidotróficas. Cuando las bacterias acetogénicas carboxidotróficas son modificadas genéticamente para expresar una enzima de una ruta biosintética de un nutriente, dicho nutriente está ausente de los nutrientes añadidos. Opcionalmente, las bacterias acetogénicas carboxidotróficas son modificadas genéticamente a partir de bacterias progenitoras que son auxotróficas para el nutriente. En una alternativa, los productos de mayor peso molecular se seleccionan del grupo que consiste en alcoholes, ácidos, dioles, ésteres, cetonas, y mezclas de los mismos. En otra alternativa, los productos de mayor peso molecular se seleccionan del grupo que consiste en etanol, acetona, 1-propanol, 2-propano, 1-butano, 2-butanol, 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol, metil etil cetona (MEK), ácido 3-hidroxi propiónico, ácido graso, terpenoides, 1,3-butadieno, 3-hidroxi butirato, ácido 2-hidroxi isobutírico, ácido acético, y mezclas de los mismos. Opcionalmente, se añade un agente selectivo al medio de cultivo, tal como un antibiótico frente al cual la bacteria deseada es resistente. El antibiótico se puede usar para inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes no deseados, o de bacterias que han perdido la enzima biosintética deseada o la ruta de enzimas. De forma destacada, puede no ser necesario el antibiótico y en algunas realizaciones no hay ningún antibiótico exógeno en el medio de cultivo. La enzima biosintética que confiere la prototrofia puede ejercer una presión selectiva suficiente para mantener un cultivo de los microorganismos deseados. Esto puede ser beneficioso en términos de ahorro de costes, protección medioambiental, y salud humana en particular. Típicamente, el medio de cultivo es una mezcla acuosa que contiene gases disueltos o no disueltos. Típicamente las condiciones de cultivo se mantienen entre una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 37°C, y un pH de entre aproximadamente 4 y hasta menos de 7. En una realización, el sustrato que contiene CO es pre-tratado para eliminar otros componentes gaseosos diferentes al CO. En algunas realizaciones el nutriente puede ser producido en exceso respecto a la cantidad requerida por las bacterias en el cultivo. En dichas realizaciones, ese exceso de nutriente puede ser recogido como producto de la fermentación.

En una realización el CO de un sustrato gaseoso que contiene CO es convertido en productos de mayor peso molecular. El sustrato gaseoso que contiene CO se hace pasar a un biorreactor que contiene un cultivo de bacterias acetogénicas carboxidotróficas en un medio de cultivo de tal modo que las bacterias convierten el CO en productos de mayor peso molecular. Los productos de mayor peso molecular son recuperados del biorreactor. Las bacterias acetogénicas carboxidotróficas son modificadas genéticamente para expresar una enzima en una ruta biosintética de un nutriente que está ausente en el medio de cultivo. Además, las bacterias acetogénicas carboxidotróficas son prototróficas para tiamina y/o pantotenato en virtud a un gen *thiC* exógeno y/o a un grupo de genes *panBCD* exógenos. El nutriente se selecciona del grupo que consiste en tiamina y pantotenato.

Composiciones usadas en los procesos de conversión de CO

Otra realización es una composición para convertir CO de un sustrato que contiene CO en productos de mayor peso molecular. La composición puede comprender bacterias acetogénicas carboxidotróficas contenidas en un medio de cultivo acuoso que tiene un pH de entre 4 y menos de 7, y uno o más nutrientes para supervivencia o crecimiento de las bacterias acetogénicas carboxidotróficas. Las bacterias acetogénicas carboxidotróficas son modificadas genéticamente para expresar una enzima de una ruta biosintética de un nutriente que está ausente del medio de cultivo, tal como tiamina o pantotenato. La composición puede estar en un recipiente tal como un biorreactor y típicamente contendrá una fuente de carbono gaseosa que comprende CO.

Otros métodos

Otra realización contemplada es un método para proporcionar un microorganismo para uso en la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero de un proceso industrial. Las secuencias genómicas del microorganismo son analizadas para determinar si un gen que codifica una enzima necesaria en una ruta biosintética de un nutriente esencial es insuficiente o defectuoso. Si se observa una enzima insuficiente o defectuosa, se suministra una versión exógena (o heteróloga) del gen al microorganismo por medio de una técnica de transferencia de genes, de tal modo que el microorganismo se vuelve prototrófico para el nutriente esencial. El gen heterólogo puede ser de una especie diferente, un género diferente, un filo diferente o incluso de un reino diferente. La complementación del defecto o carencia genéticos convertirá al microorganismo en prototrófico.

Otra realización adicional contemplada es un método para transferir un ácido nucleico exógeno en una población de bacterias acetogénicas carboxidotróficas que son auxotróficas para tiamina y/o pantotenato. Las bacterias son transformadas con un primer ácido nucleico que comprende un gen *thiC* exógeno o un grupo de genes *panBCD* exógenos ligados operativamente a un promotor.

La prototrofia de tiamina y/o la prototrofia de pantotenato se seleccionan entre la población bacteriana transformada. Opcionalmente, las bacterias pueden ser co-transformadas con un segundo ácido nucleico que comprende un gen exógeno o endógeno que confiere una propiedad deseada cuando se expresa en la bacteria. La propiedad deseada no tiene porqué ser seleccionable. El primer y el segundo ácidos nucleicos pueden estar en moléculas separadas o en la misma molécula. Opcionalmente se puede emplear una etapa adicional para cribar bacterias prototróficas transformadas en términos de la presencia del primer ácido nucleico. En determinadas circunstancias, puede ser necesario y/o deseable tratar el primer y el segundo ácidos nucleicos para formar un primer y un segundo ácidos nucleicos metilados antes de la etapa de co-transformación.

Otra realización adicional usa la prototrofia como marcador seleccionable en sí misma para los transformantes, en ausencia de cualquier otro agente selectivo tal como un antibiótico. La prototrofia puede ser para una vitamina, tal como se muestra más adelante, o para cualquier otro nutriente esencial. La selección limpia en ausencia de un antibiótico fue inesperada. Este tipo de selección puede usarse con cualquier *Clostridium* descrito en la presente memoria, así como en otras bacterias gram negativas y gram positivas, tanto en condiciones de crecimiento aerobias como anaerobias.

También se puede decir que la invención consiste de forma amplia en las partes, elementos y características referidas o indicadas en la especificación de la solicitud, individualmente o colectivamente, en cualquiera o en todas las combinaciones de dos o más de dichas partes, elementos o características.

Breve descripción de las figuras

Éstos y otros aspectos de la presente invención, que deberían ser considerados en todos sus aspectos novedosos, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, que se proporciona meramente a modo de ejemplo, en referencia a las figuras acompañantes, en las que:

Figura 1: Crecimiento y perfil de metabolitos de LZ1561 en un cultivo continuo entre los días veinte y veintiocho.

Figura 2: Disposición genómica de la secuencia de nucleótidos de la región *thiC/purF* de *C. ragsdalei*, amplificada mediante PCR.

Figura 3: Mapa de plásmido de pMTL85246-*thiC*-*purF*.

Figura 4: Disposición genómica de la secuencia de nucleótidos del operón panBCD de *C. beijerinckii*.

Figura 5: Comparación de crecimiento de *C. autoethanogenum* DSM23693 natural y la cepa que porta el plásmido pMTL85246-*thiC*-*purF* en ausencia de tiamina.

Un listado de secuencias es parte de esta solicitud.

Descripción detallada de la invención

A continuación se incluye una descripción de la presente invención, que incluye las realizaciones preferidas de la misma, proporcionadas en términos generales. La invención se elucida adicionalmente a partir de la descripción proporcionada bajo el título "Ejemplos" más adelante en la presente memoria, que proporciona datos experimentales que apoyan a la invención, ejemplos específicos de diversos aspectos de la invención, y los medios para llevar a cabo la invención.

Sorprendentemente los inventores han identificado que uno o más gen(es) de una ruta de biosíntesis para una vitamina que es necesaria para la supervivencia de un microorganismo se pueden usar como marcador selectivo efectivo para cribar células transformadas con ácido(s) nucleico(s) exógeno(s) en donde el microorganismo no contiene o expresa de forma natura el uno o más gen(es).

Esto presenta una serie de ventajas, que incluyen obviar la necesidad del uso de marcadores y agentes selectivos estándar, tal como antibióticos, que son caros, presentan limitaciones y pueden ser tóxicos para algunas células deseables. También tiene el beneficio de reducir adicionalmente el coste del crecimiento y la fermentación de microorganismos recombinantes ya que se pueden omitir las vitaminas que típicamente sería necesario añadir al medio de crecimiento y fermentación. Además, las vitaminas en sí mismas son un producto valioso, de tal modo que además de actuar como marcadores de selección, las vitaminas producidas pueden ser recuperadas y vendidas o usadas para otros fines.

Tal como se usa en la presente memoria, un "caldo de fermentación" es un medio de cultivo que comprende al menos un medio nutriente y células bacterianas.

Tal como se usa en la presente memoria, un "microorganismo lanzadera" es un microorganismo en el cual se expresa una enzima metiltransferasa y es distinto del microorganismo de destino.

Tal como se usa en la presente memoria, un "microorganismo de destino" es un microorganismo en el que los genes incluidos en una vector/construcción de expresión son expresados y es distinto del microorganismo lanzadera.

El término “producto principal de fermentación” pretende indicar el producto de fermentación que es producido en la mayor concentración y/o el mayor rendimiento.

Los términos “aumentar la eficacia”, “eficacia aumentada” y similares, cuando se usan en relación a un proceso de fermentación, incluyen, aunque sin limitación, aumentar una o más de las velocidades de crecimiento de los microorganismos que catalizan la fermentación, la tasa de crecimiento y/o de producción de producto a concentraciones elevadas de producto, el volumen de producto deseado producido por volumen de sustrato consumido, la velocidad de producción o el nivel de producción del producto deseado, y la proporción relativa del producto deseado producido en comparación con otros sub-productos de la fermentación.

La frase “sustrato que comprende monóxido de carbono” y términos similares debería entenderse que incluye cualquier sustrato en el cual el monóxido de carbono está disponible para una o más cepas de bacterias para el crecimiento y/o la fermentación, por ejemplo.

La frase “sustrato gaseoso que comprende monóxido de carbono” y frases y términos similares incluye cualquier gas que contiene un nivel de monóxido de carbono. En determinadas realizaciones el sustrato contiene al menos aproximadamente del 20% a aproximadamente 100% de CO en volumen, del 20% al 70% de CO en volumen, del 30% al 60% de CO en volumen, y del 40% al 55% de CO en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% de CO, o aproximadamente 55% de CO o aproximadamente 60% de CO en volumen.

Aunque no es necesario que el sustrato contenga hidrógeno, la presencia de H₂ no debería ser perjudicial para la formación de producto según los métodos de la invención. En realizaciones particulares, la presencia de hidrógeno da como resultado una eficacia global mejorada de la producción de alcohol. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el sustrato puede comprender una relación de H₂:CO de aproximadamente 2:1, o 1:1, o 1:2. En una realización el sustrato comprende aproximadamente un 30% o menos de H₂ en volumen, un 20% o menos de H₂ en volumen, aproximadamente un 15% o menos de H₂ en volumen o aproximadamente un 10% o menos de H₂ en volumen. En otras realizaciones, la corriente de sustrato comprende bajas concentraciones de H₂, por ejemplo, menos del 5%, o menos del 4%, o menos del 3%, o menos del 2%, o menos del 1%, o está sustancialmente libre de hidrógeno. El sustrato también puede contener algo de CO₂ por ejemplo, tal como aproximadamente entre el 1% y el 80% en volumen de CO₂, o entre el 1% y aproximadamente el 30% de CO₂ en volumen. En una realización, el sustrato comprende una cantidad de CO₂ inferior o igual al 20% en volumen. En realizaciones particulares, el sustrato comprende una cantidad de CO₂ inferior o igual al 15% en volumen, una cantidad de CO₂ inferior o igual al 10% en volumen, una cantidad de CO₂ inferior o igual al 5% en volumen, o sustancialmente nada de CO₂.

En la descripción incluida a continuación, se describen realizaciones de la invención en términos de administración y fermentación de un “sustrato gaseoso que contiene CO”. Sin embargo, debería apreciarse que el sustrato gaseoso puede proporcionarse en formas alternativas. Por ejemplo, el sustrato gaseoso que contiene CO puede proporcionarse disuelto en un líquido. Esencialmente, se satura un líquido con un gas que contiene monóxido de carbono y a continuación dicho líquido es añadido al biorreactor. Esto puede lograrse usando metodologías estándar. A modo de ejemplo, se podría usar un generador de dispersión de microburbujas (Hensirisak et. al. Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology, Volumen 101, Número 3 / Octubre, 2002). A modo de ejemplo adicional, el sustrato gaseoso que contiene CO podría adsorberse sobre un soporte sólido. Dichos métodos alternativos son abarcados por el uso del término “sustrato que contiene CO” y similares.

En realizaciones particulares de la invención, el sustrato gaseoso que contiene CO es un corriente industrial o gas residual. “Gases residuales o de salida industriales” debería considerarse de forma amplia para incluir cualquier gas que comprende CO producido en un proceso industrial, e incluye gases producidos como resultado de la fabricación de productos metálicos férreos, la fabricación de productos metálicos no férreos, procesos de refinado de petróleo, gasificación de carbón, gasificación de biomasa, producción de electricidad, producción de negro de humo, y fabricación de coque. En otros lugares de la presente memoria se pueden encontrar ejemplos adicionales.

A menos que el contexto requiera lo contrario, las frases “fermentación”, “proceso de fermentación” o “reacción de fermentación” y similares, tal como se usan en la presente memoria, pretenden abarcar tanto la fase de crecimiento como la fase de biosíntesis de producto del proceso. Como se describirá más detalladamente en la presente memoria, en algunas realizaciones el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. Como tal, la adición de metales o composiciones a una reacción de fermentación debería entenderse que incluye la adición a uno cualquiera o a ambos reactores.

El término “biorreactor” incluye un dispositivo de fermentación que consiste en uno o más recipientes y/o torres o disposición de conducciones, que incluye el Reactor Continuo de Tanque Agitado (CSTR), el Reactor de Células Inmovilizada (ICR), el Reactor de Lecho de Goteo (TBR), Columna de Burbujeo, Fermentador de Elevación de Gas, Mezclador Estático, u otro recipiente u otro dispositivo adecuado para el contacto gas-líquido. En algunas realizaciones, el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un segundo reactor de fermentación. En algunas realizaciones el biorreactor puede comprender un primer reactor de crecimiento y un

segundo reactor de fermentación. Como tal, cuando se hace referencia a la adición de sustrato al biorreactor o a la reacción de fermentación, debería entenderse que incluye la adición a uno cualquiera o ambos reactores, cuando sea apropiado.

“Ácidos nucleicos exógenos” son ácidos nucleicos que se originan fuera del microorganismo al cual son introducidos.

5 Los ácidos nucleicos exógenos pueden derivar de cualquier fuente apropiada, que incluye, aunque sin limitación, cepas o especies de microorganismos que difieren del organismo al cual se van a introducir, o pueden ser creados artificialmente o recombinantemente. Los ácidos nucleicos exógenos representan secuencias de ácido nucleico que no están presentes de forma natural dentro del microorganismo al cual van a ser introducidos, y permiten la expresión de un producto no presente de forma natural en el microorganismo. El ácido nucleico exógeno puede adaptarse para integrarse en el genoma del microorganismo en el cual es introducido, o permanecer en un estado extra-cromosómico. Típicamente, el ácido nucleico exógeno es heterólogo, procede de una especie diferente, un género diferente o un filo o reino diferente, al del receptor.

Cabe destacar que la invención se puede llevar a la práctica usando ácidos nucleicos cuya secuencia varía respecto a las secuencias ejemplificadas específicamente en la presente memoria siempre que lleven a cabo sustancialmente la misma función. Para las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína o péptido esto significa que la proteína o péptido codificados tienen sustancialmente la misma función. Para secuencias de ácido nucleico que representan secuencias promotoras, la secuencia variante tendrá la capacidad de promover la expresión de uno o más genes. Dichos ácidos nucleicos pueden ser referidos en la presente memoria como “variantes funcionalmente equivalentes”. A modo de ejemplo, las variantes funcionalmente equivalentes de un ácido nucleico incluyen variantes alélicas, fragmentos de un gen, genes que incluyen mutaciones (eliminación, inserción, sustituciones de nucleótidos y similares) y/o polimorfismos y similares. También se pueden considerar como ejemplos de variantes funcionalmente equivalentes de las secuencias ejemplificadas específicamente en la presente memoria los genes homólogos procedentes de otros microorganismos. Éstos incluyen genes homólogos en especies tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium beijerinckii*, los detalles de las cuales se encuentran disponibles públicamente en páginas web tales como Genbank o NCBI. La frase “variantes funcionalmente equivalentes” debería considerarse que incluye ácidos nucleicos cuya secuencia varía como resultado de una optimización de codón para un organismo particular. Las “variantes funcionalmente equivalentes” de un ácido nucleico en la presente memoria preferiblemente presentarán al menos aproximadamente 70%, preferiblemente aproximadamente 80%, más preferiblemente aproximadamente 85%, preferiblemente aproximadamente 90%, preferiblemente aproximadamente 95% o más de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto al ácido nucleico identificado.

También debería apreciarse que la invención puede llevarse a la práctica usando polipéptidos cuya secuencia varía respecto a las secuencias de aminoácido ejemplificadas específicamente en la presente memoria. Dichas variantes pueden ser referidas en la presente memoria como “variantes funcionalmente equivalentes”. Una variante funcionalmente equivalente de una proteína o péptido incluye aquellas proteínas o péptidos que comparten al menos el 40%, preferiblemente el 50%, preferiblemente el 60%, preferiblemente el 70%, preferiblemente el 75%, preferiblemente el 80%, preferiblemente el 85%, preferiblemente el 90%, preferiblemente el 95% o más de identidad de aminoácidos con respecto a la proteína o péptido identificado, y presenta sustancialmente la misma función que el péptido o proteína de interés. Dichas variantes incluyen dentro de su alcance fragmentos de una proteína o péptido en donde el fragmento comprende una forma truncada del polipéptido, en donde las eliminaciones pueden ser de 1 a 5, a 10, a 15, a 20, a 25 aminoácidos, y pueden extenderse desde el residuo 1 hasta el 25 en cualquiera de los extremos del polipéptido, y en donde las eliminaciones pueden tener cualquier longitud dentro de la región, o pueden estar en una localización interna. Las variantes funcionalmente equivalentes de los polipéptidos específicos de la presente memoria también debería considerarse que incluyen polipéptidos expresados por genes homólogos en otras especies de bacterias, por ejemplo, como se ha ejemplificado en el párrafo previo.

45 “Sustancialmente la misma función” tal como se usa en la presente memoria pretende indicar que el ácido nucleico o polipéptido es capaz de llevar a cabo la función del ácido nucleico o polipéptido del cual es una variante. Por ejemplo, una variante de una enzima de la invención será capaz de catalizar la misma reacción que dicha enzima. Sin embargo, no debería considerarse que significa que la variante tiene el mismo nivel de actividad que el polipéptido o ácido nucleico del cual es una variante.

50 Uno puede determinar si una variante funcionalmente equivalente presenta sustancialmente la misma función que el ácido nucleico o polipéptido del cual es una variante usando cualquier número de métodos conocidos. Sin embargo, a modo de ejemplo, los métodos descritos en Zhang et al (1997, J. Bacteriol., 179: 3030-5), Lawhorn et al. (2004, Organic & Biomolecular Chemistry, 2: 2538-46) pueden usarse para determinar la funcionalidad con respecto a ThiC, Powers & Snell (1976, Biol. Chem. 251, 3786-3793) puede usarse para determinar la funcionalidad con respecto a PanB, Cronan et al. (1982, J. Bacteriol. 149: 916-922) puede usarse para determinar la funcionalidad con respecto a PanC, o Williamson (1985, Methods Enzymol. 113: 589-595) puede usarse para determinar la funcionalidad con respecto a PanD, o se puede usar un tamiz genético como el descrito por Lawhorn et al. (2004, J. Soc. Biol. Chem., 279: 43555-9) con respecto a genes de tiamina.

60 Un “microorganismo progenitor” es un microorganismo usado para generar un microorganismo recombinante de la invención. El microorganismo progenitor puede ser uno que exista en la naturaleza (es decir, un microorganismo natural) o uno que haya sido modificado previamente pero que no exprese una o más de las enzimas de la ruta de

biosíntesis de una o más vitaminas que son necesarias para el crecimiento del microorganismo. Por consiguiente, los microorganismos recombinantes de la invención han sido modificados para expresar la una o más enzimas que no eran expresadas en el microorganismo progenitor.

5 Los términos “construcciones” o “vectores” de ácido nucleico, y términos similares, deberían considerarse de forma amplia para incluir cualquier ácido nucleico (que incluye ADN y ARN) adecuado para uso como vehículo para transferir material genético a una célula. Debería considerarse que los términos incluyen plásmidos, virus (que incluyen bacteriófagos), cósmidos y cromosomas artificiales. Las construcciones o vectores pueden incluir uno o más elementos reguladores, un origen de replicación, un sitio de multiclonación y/o un marcador seleccionable. En una descripción, las construcciones o vectores son adaptadas para permitir la expresión de uno o más genes codificados por la construcción o vector. Las construcciones o vectores de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos desnudos, así como ácidos nucleicos formulados con uno o más agentes para facilitar la administración a una célula (por ejemplo, ácido nucleico conjugado a liposoma, un organismo en el cual está contenido el ácido nucleico).

15 La invención es aplicable a la producción de “uno o más productos” por fermentación microbiana. La referencia a “uno o más productos” debería considerarse de forma amplia para incluir cualquier producto que puede ser producido mediante fermentación microbiana. Sin embargo, a modo de ejemplo, incluye etanol, acetato, butanol, isopropanol, una o más vitaminas, acetona, 2,3-butanodiol.

“Microorganismos contaminantes” o “microorganismos no deseados” deberían considerarse de forma amplia para indicar cualquier microorganismo que no sea deseado, por cualquiera que sea la razón.

20 Cuando se usan en el contexto de los métodos de la invención, “prevención del crecimiento” y términos similares deberían considerarse de forma amplia para incluir cualquier nivel de prevención o reducción del crecimiento de uno o más microorganismos. No debería considerarse que significan que el crecimiento de un microorganismo es prevenido, inhibido o detenido completamente. Sin embargo, en una realización preferida el crecimiento del microorganismo es prevenido sustancialmente.

25 “Necesaria para el crecimiento” debe considerarse que significa que la vitamina es requerida para un nivel deseado de crecimiento, de tal modo que la ausencia de vitamina en un medio en el cual, o sobre el cual, crecerá un microorganismo es suficiente para seleccionar un microorganismo recombinante (capaz de fabricar la vitamina) o seleccionar contra un microorganismos no deseado o contaminante. En una realización, una vitamina es “esencial para el crecimiento” del microorganismo. En este caso, sin la vitamina, un microorganismo no crecerá sustancialmente, o puede morir.

30 “Anaerobio” o “microorganismo anaeróbico” o términos similares deberían considerarse de forma amplia para incluir tanto anaerobios estrictos como facultativos.

Microorganismos recombinantes

35 Tal como se ha discutido previamente en la presente memoria, la invención proporciona un microorganismo recombinante. El microorganismo recombinante comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica uno o más gen(es) en la ruta de biosíntesis de una o más vitaminas que producen una(s) vitamina(s) que es(son) necesaria(s) para el crecimiento del microorganismo. El microorganismo recombinante, por consiguiente, es capaz de producir la una o más vitamina(s). El microorganismo recombinante es un anaerobio.

El microorganismo recombinante es producido a partir de un microorganismo progenitor.

40 El microorganismo progenitor puede elegirse de cualquier microorganismo que carezca de uno o más genes en la ruta de biosíntesis de la una o más vitaminas.

En una descripción, la vitamina se elige entre tiamina, patotenato, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, biotina, ácido fólico y cianocobalamina. En una realización particular, la vitamina es tiamina (B1) o pantotenato (B5).

45 La una o más enzimas puede una cualquiera que esté implicada en una ruta de biosíntesis de vitaminas. Sin embargo, a modo de ejemplo, la una o más enzimas pueden elegirse entre aquellas enumeradas a continuación en las Tablas 1 a 8.

Tabla 1: Biosíntesis de tiamina (B1):

cisteína desulfurasa [EC:2.8.1.7]
glicina oxidasa [EC:1.4.3.19]
hidroxietiltiazol quinasa [EC:2.7.1.50]

hidroximetilpirimidina [EC:2.7.4.7]
nucleósido-trifosfatasa [EC:3.6.1.15]
fosfometilpirimidina quinasa [EC: 2.7.1.49]
selenocisteína liasa [EC:4.4.1.16]
proteína portadora de azufre TiS adenililtransferasa [EC:2.7.7.73]
tiaminasa [EC:3.5.99.2]
proteína de biosíntesis de tiamina TiC [EC 4.1.99.17]
proteína de biosíntesis de tiamina TiG
proteína de biosíntesis de tiamina TiH
proteína de biosíntesis de tiamina TiI
tiamina quinasa [EC:2.7.1.89]
tiamina piridinilasa [EC:2.5.1.2]
tiamina pirofosfoquinasa [EC:2.7.6.2]
tiamina-monofosfato quinasa [EC:2.7.4.16]
tiamina-fosfato pirofosforilasa [EC:2.5.1.3]
tiamina-trifosfatasa [EC:3.6.1.28]

Tabla 2: Biosíntesis de riboflavina (B2):

GTP ciclohidrolasa II [EC:3.5.4.25]
2,5-diamino-6-(ribosilamino)-4(3H)-pirimidinona 5'-fosfato reductasa [EC: 1.1.1.302]
2-amino-5-formilamino-6-ribosilaminopirimidin-4(3H)-ona 5'-monofosfato desformilasa [EC:3.5.1.102]
3,4-dihidroxi 2-butanona 4-fosfato sintasa [EC:4.1.99.12]
4-fitasa / fosfatasa ácida [EC:3.1.3.2 / 3.1.3.26]
5,6-dimetilbencimidazol sintasa [EC: 1.14.99.40]
5-amino-6-(5-fosforibosilamino)uracilo reductasa [EC: 1.1.1.193]
6,7-dimetil-8-ribitillumacina sintasa [EC:2.5.1.78]
fosfatasa ácida (clase A) [EC:3.1.3.2]
fosfatasa ácida (clase B) [EC:3.1.3.2]

ES 2 661 953 T3

fosfatasa ácida [EC:3.1.3.2]
acuacobalamina reductasa / NAD(P)H-flavina reductasa [EC: 1.5.1.41 / 1.16.1.3]
biliverdina reductasa / flavina reductasa [EC:1.5.1.30 / 1.3.1.24]
diaminohidroxifosforribosilaminopirimidina desaminasa / 5-amino-6-(5-fosforribosilamino)uracilo reductasa [EC: 1.1.1.193 / 3.5.4.26]
diaminohidroxifosforribosilaminopirimidina desaminasa [EC:3.5.4.26]
ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa, miembro de la familia 1/3 [EC:3.6.1.9 / 3.1.4.1]
FAD sintetasa [EC:2.7.7.2]
FMN reductasa [EC:1.5.1.38]
GTP ciclohidrolasa II [EC:3.5.4.25]
GTP ciclohidrolasa IIa [EC:3.5.4.29]
fosfotirosina proteína de bajo peso molecular fosfatasa [EC:3.1.3.48 / 3.1.3.2]
Ácido lisofosfatídico fosfatasa tipo 6 [EC:3.1.3.2]
FMN adenililtransferasa [EC:2.7.7.2]
riboflavina quinasa [EC:2.7.1.26 / EC:2.7.1.161]
riboflavina sintasa [EC:2.5.1.9]
fosfatasa ácida resistente a tartrate tipo 5 [EC:3.1.3.2]
tARN pseudouridina sintasa 8 / 2,5-diamino-6-(5-fosfo-D-ribitilamino)-pirimidin-4(3H)-ona desaminasa [EC:5.4.99.-]
tirosinasa [EC:1.14.18.1]

Tabla 3: Biosíntesis de ácido nicotínico (B3):

5'-nucleotidasa [EC:3.1.3.5]
6-hidroxi-3-succinoilpiridina hidroxilasa [EC:3.7.1.-]
6-hidroxinicotinato 3-monooxigenasa [EC: 1.14.13.114]
aldehído oxidasa [EC: 1.2.3.1]
aspartato deshidrogenasa [EC:1.4.1.21]
NMN bifuncional adenililtransferasa/nudix hidrolasa [EC:3.6.1.- 2.7.7.1]
ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa miembro de la familia 1/3 [EC:3.6.1.9 3.1.4.1]

ES 2 661 953 T3

enamidasa [EC:3.5.2.18]
L-aspartato oxidasa [EC: 1.4.3.16]
maleamato amidohidrolasa [EC:3.5.1.107]
maleato isomerasa [EC:5.2.1.1]
NAD(P) transhidrogenasa [EC: 1.6.1.1]
NAD(P) transhidrogenasa subunidad alfa [EC: 1.6.1.2]
NAD(P) transhidrogenasa subunidad beta [EC: 1.6.1.2]
NAD+ difosfatasa [EC:3.6.1.22]
NAD+ quinasa [EC:2.7.1.23]
NAD+ nucleosidasa [EC:3.2.2.5]
NAD+ sintasa (de hidrólisis de glutamina) [EC:6.3.5.1]
NAD+ sintasa [EC:6.3.1.5]
N-formilmaleamato desformilasa [EC:3.5.1.106]
nicotinamidasa [EC:3.5.1.19]
nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa [EC:2.7.7.18 2.7.7.1]
nicotinamida N-metiltransferasa [EC:2.1.1.1]
nicotinamida fosforribosiltransferasa [EC:2.4.2.12]
nicotinamida ribosida quinasa [EC:2.7.1.22]
nicotinamida-nucleótido adenililtransferasa [EC:2.7.7.1]
nicotinato fosforribosiltransferasa [EC:2.4.2.11]
nicotinato-nucleótido adenililtransferasa [EC:2.7.7.18]
nicotinato-nucleótido pirofosforilasa (carboxilante) [EC:2.4.2.19]
purina nucleosidasa [EC:3.2.2.1]
purina-nucleósido fosforilasa [EC:2.4.2.1]
piracinamidasa [EC:3.5.1.-]
quinolinato sintasa [EC:2.5.1.72]
UDP-azúcar difosfatasa [EC:3.6.1.45]

Tabla 4: Biosíntesis de pantotenato (B5):

2-dehidropantoato 2-reductasa [EC: 1.1.1.169]
3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferasa PanB [EC:2.1.2.11]
4'-fosfopanteteinil transferasa [EC:2.7.8.-]
4-fosfopantoato--beta-alanina ligasa [EC:6.3.2.36]
acetolactato sintasa I/II/III subunidad grande [EC:2.2.1.6]
acetolactato sintasa I/III subunidad pequeña [EC:2.2.1.6]
acetolactato sintasa II subunidad pequeña [EC:2.2.1.6]
Proteína portadora de acilo fosfodiesterasa [EC:3.1.4.14]
aspartato 1-descarboxilasa PanD [EC:4.1.1.11]
beta-ureidopropionasa [EC:3.5.1.6]
biotina-[acetil-CoA-carboxilasa] ligasa [EC:6.3.4.15]
amino ácido de cadena ramificada aminotransferasa [EC:2.6.1.42]
desfosfo-CoA quinasa [EC:2.7.1.24]
dihidropirimidinasa [EC:3.5.2.2]
dihidropirimidina deshidrogenasa (NADP+) [EC:1.3.1.2]
dihidroxi-ácido deshidratasa [EC:4.2.1.9]
ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa miembro de la familia 1/3 [EC:3.6.1.9 3.1.4.1]
holo-[proteína portadora de acilo] sintasa [EC:2.7.8.7]
quetol-ácido reductoisomerasa [EC: 1.1.1.86]
panteteína hidrolasa [EC:3.5.1.92]
panteteína-fosfato adenililtransferasa [EC:2.7.7.3]
pantoato quinasa [EC:2.7.1.169]
pantoato ligasa / citidilato quinasa [EC:2.7.4.14 / 6.3.2.1]
pantoato--beta-alanina ligasa PanC [EC:6.3.2.1]
fosfopanteteína adenililtransferasa / desfosfo-CoA quinasa [EC:2.7.1.24 2.7.7.3]
fosfopantotenato-cisteína ligasa [EC:6.3.2.5]

fosfopantotenato--cisteína ligasa [EC:6.3.2.5]
fosfopantotenoilcisteína descarboxilasa [EC:4.1.1.36]
pantotenato quinasa tipo I [EC:2.7.1.33]
pantotenato quinasa tipo II [EC:2.7.1.33]
pantotenato quinasa tipo III [EC:2.7.1.33]

Tabla 5: Biosíntesis de piridoxina (B6):

4-hidroxitreonina-4-fosfato deshidrogenasa [EC:1.1.1.262]
aldehído oxidasa [EC:1.2.3.1]
D-eritrosa 4-fosfato deshidrogenasa [EC:1.2.1.72]
eritronato-4-fosfato deshidrogenasa [EC: 1.1.1.290]
glutamina amidotransferasa [EC:2.6.-.-]
fosfoserina aminotransferasa [EC:2.6.1.52]
piridoxal fosfatasa [EC:3.1.3.74]
piridoxal fosfato fosfatasa [EC:3.1.3.74]
piridoxamina 5'-fosfato oxidasa [EC: 1.4.3.5]
piridoxina 4-deshidrogenasa [EC:1.1.1.65]
piridoxina 5-fosfato sintasa [EC:2.6.99.2]
proteína de biosíntesis de piridoxina [EC:4.-.-.-]
piridoxina quinasa [EC:2.7.1.35]
treonina sintasa [EC:4.2.3.1]

Tabla 6: Biosíntesis de biotina (B7):

6-carboxihexanoato--CoA ligasa [EC:6.2.1.14]
8-amino-7-oxononanoato sintasa [EC:2.3.1.47]
adenosilmetionina-8-amino-7-oxononanoato aminotransferasa [EC:2.6.1.62]
biotina sintetasa [EC:2.8.1.6]
biotina-[acetil-CoA-carboxilasa] ligasa [EC:6.3.4.15]

biotinidasa [EC:3.5.1.12]
biotina--proteína ligasa [EC:6.3.4.15 6.3.4.11 6.3.4.10 6.3.4.9]
destiobiotina sintetasa [EC:6.3.3.3]
pantotenato quinasa tipo III [EC:2.7.1.33]

Tabla 7: Biosíntesis de folato (B9) / p-Aminobenzoato (B10):

2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetildihidropteridina difosfoquinasa [EC:2.7.6.3]
4-amino-4-deoxicorismato liasa [EC: 2.6.1.85 / EC:4.1.3.38]
6-piruviloil tetrahidrobiopterina sintasa [EC:4.2.3.12]
6-piruviloiltetrahidropterina 2'-reductasa [EC: 1.1.1.220]
alcalina fosfatasa [EC:3.1.3.1]
dihidrofolato reductasa [EC: 1.5.1.3]
dihidrofolato sintasa / folilpoliglutamato sintasa [EC:6.3.2.17 / 6.3.2.12]
dihidromonapterina reductasa [EC: 1.5.1.-]
dihidroneopterina aldolasa / 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetildihidropteridina difosfoquinasa [EC:2.7.6.3 / 4.1.2.25]
dihidroneopterina aldolasa [EC:4.1.2.25]
dihidropteridina reductasa [EC: 1.5.1.34]
dihidropteroato sintasa [EC:2.5.1.15]
folilpoliglutamato sintasa [EC:6.3.2.17]
gamma-glutamil hidrolasa [EC:3.4.19.9]
GTP ciclohidrolasa I [EC:3.5.4.16]
proteína de biosíntesis de cofactor de molibdeno
Subunidad catalítica de molibdeno sintasa [EC:2.-.-.]
Subunidad portadora de azufre de molibdeno sintasa
para-aminobenzoato sintetasa [EC:2.6.1.85]
para-aminobenzoato sintetasa componente I [EC:2.6.1.85]
para-aminobenzoato sintetasa componente II [EC:2.6.1.85]

sepiapterina reductasa [EC: 1.1.1.153]
timidilato sintasa [EC:2.1.1.45]

Tabla 8: Biosíntesis de cobalamina (B12):

5-aminolevulinato sintasa [EC:2.3.1.37]
5-aminolevulinato:piruvato aminotransferasa [EC 2.6.1.43]
adenosilcobinamida quinasa / adenosilcobinamida-fosfato guanililtransferasa [EC:2.7.1.156 / 2.7.7.62]
adenosilcobinamida-GDP ribazoltransferasa [EC:2.7.8.26]
adenosilcobinamida-fosfato sintasa [EC:6.3.1.10]
Ácido adenosilcobírico sintasa [EC:6.3.5.10]
alfa-ribazol fosfatasa [EC:3.1.3.73]
cob(II)alamina adenosiltransferasa [EC:2.5.1.17]
Ácido cob(II)irínico a,c-diamida reductasa [EC:1.16.8.1]
cobalto-precorrina 5A hidrolasa [EC:3.7.1.12]
cobalto-precorrina-5B (C1)-metiltransferasa [EC:2.1.1.195]
cobalto-precorrina-7 (C15)-metiltransferasa [EC:2.1.1.196]
cobaltoquelatasa CobN [EC:6.6.1.2]
Ácido cobirínico a,c-diamida sintasa [EC:6.3.5.9 / 6.3.5.11]
ferritina [EC: 1.16.3.1]
glutamato-1-semialdehído 2,1-aminomutasa [EC:5.4.3.8]
glutamil-tARN reductasa [EC: 1.2.1.70]
glutamil-tARN sintetasa [EC:6.1.1.17]
hidroximetilbilano sintasa [EC:2.5.1.61]
nicotinato-nucleótido--dimetilbencimidazol fosforribosiltransferasa [EC:2.4.2.21]
coproporfirinógeno independiente de oxígeno III oxidasa [EC: 1.3.99.22]
porfobilinógeno sintasa [EC:4.2.1.24]
precorrina-2 deshidrogenasa / sirohidroclorina ferroquelatasa [EC:1.3.1.76 / 4.99.1.4]
precorrina-2/cobalto-factor-2 C20-metiltransferasa [EC:2.1.1.130 / 2.1.1.151]

precorrina-3B sintasa [EC:1.14.13.83]
precorrina-3B C17-metiltransferasa [EC:2.1.1.131]
precorrina-4 C11-metiltransferasa [EC :2.1.1.133]
precorrina-6X reductasa [EC: 1.3.1.54]
precorrina-6Y C5,15-metiltransferasa [EC:2.1.1.132]
precorrina-8W descarboxilasa [EC: 1.-.-.-]
precorrina-8X metilmutasa [EC:5.4.1.2]
sirohidroclorina cobaltoquelatasa [EC:4.99.1.3]
treonina-fosfato descarboxilasa [EC:4.1.1.81]
uroporfirinógeno descarboxilasa [EC:4.1.1.37]
uroporfirinógeno III metiltransferasa / sintasa [EC:2.1.1.107 4.2.1.75]

5 En una realización particular, el microorganismo progenitor carece de uno o más de los genes que codifican las enzimas de proteína de biosíntesis de tiamina ThiC (EC 4.1.99.17), 3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferasa PanB (EC 2.1.2.11), pantoato-beta-alanina ligasa PanC (EC 6.3.2.1), y aspartato 1-descarboxilasa Pan D (EC 4.1.1.11). En una realización, el microorganismo progenitor carece del gen que codifica la enzima ThiC. En otra realización, el microorganismo progenitor carece de una o más enzimas que codifican una o más o todas de PanB, PanC y PanD.

10 Aunque la invención se ejemplifica en la presente memoria en relación a determinadas rutas de biosíntesis de vitaminas, se apreciará que se pueden usar otras rutas biosintéticas. Con el conocimiento de la presente invención, se puede realizar el análisis de cualquier organismo secuenciado usando bases de datos como la "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>; Kanehisa et al., 2012, Nucleic Acids Res. 40, 3109-D114; Kanehisa and Goto, 2000, Nucleic Acids Res. 28, 27-30) o BioCyc (<http://biocyc.org/>; Caspi et al., 2010, Nucleic Acids Res. 38: D473-479) para identificar genes que están presentes o que faltan en una ruta biosintética particular.

15 El microorganismo progenitor puede elegirse entre cualquiera del grupo de microorganismos anaeróbicos, en una realización bacterias anaeróbicas.

En una realización, el microorganismo se selecciona del grupo que comprende los géneros *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteriodes*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* o *Veillonella*.

20 En una realización particular, el microorganismo progenitor se selecciona del grupo de bacterias acetogénicas carboxidotróficas. En determinadas realizaciones el microorganismo se selecciona del grupo que comprende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii* y *Thermoanaerobacter kiuvi*.

30 En una realización particular, el microorganismo progenitor se selecciona del grupo de Clostridia etanologénicas, acetogénicas, que comprende las especies *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* y *C. ragsdalei* y elementos aislados relacionados. Éstos incluyen, aunque sin limitación, las cepas *C. autoethanogenum* JAI-1^T (DSM10061) [Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., una bacteria anaeróbica que produce etanol a partir de monóxido de carbono. Arch Microbiol 1994, 4: 345-351], *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) [Simpson SD, Forster RL, Tran PT, Rowe MJ, Warner IL: Novel bacteria and methods thereof. Patente internacional 2009, WO/2009/064200], *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETC^T (DSM13528 = ATCC 55383) [Tanner RS, Miller LM, Yang D: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology

Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43: 232-236], *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) [Gaddy JL: *Clostridium* stain which produces acetic acid from waste gases. Patente de EE.UU 1997, 5.593.886], *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth. Patente de EE.UU, 2002, 6.368.819], *C. ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth. Patente de EE.UU, 2002, 6.368.819], *C. ragsdalei* P11^T (ATCC BAA-622) [Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. Patente internacional 2008, WO 2008/028055], elementos aislados relaciones tales como "*C. coskatii*" [Zahn *et al* - Novel ethanologenic species *Clostridium coskatii* (Solicitud de Patente de EE.UU número US20110229947)] y "*Clostridium sp.*" (Tyurin *et al.*, 2012, J. Biotech Res. 4: 1-12), o cepas mutadas tales como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*. Tesis Doctoral, North Carolina State University, 2010). Estas cepas forman un subgrupo dentro del grupo I de ARNr Clostridial, y su gen 16S rARN es idéntico en más de un 99% con un contenido de GC bajo similar de aproximadamente 30%. Sin embargo, la re-asociación ADN-ADN y los experimentos de huella dactilar de ADN mostraron que estas cepas pertenecen a distintas especies [Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. Patente Internacional 2008, WO 2008/028055].

Todas las especies de este grupo presentan una morfología y tamaño similares (las células en crecimiento logarítmico están entre 0,5-0,7 x 3-5 µm), son mesófilicas (temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C) y estrictamente anaerobias [Tanner RS, Miller LM, Yang D: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43: 232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4: 345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. Patente Internacional 2008, WO 2008/028055]. Además, todas ellas comparten los mismos rasgos filogenéticos principales, tal como el mismo rango de pH (pH 4-7,5, con un pH inicial óptimo de 5,5-6), un fuerte crecimiento autotrófico en gases que contienen CO con velocidades de crecimiento similares, y un perfil metabólico similar con etanol y ácido acético como principales productos finales de fermentación, formándose pequeñas cantidades de 2,3-butanodiol y ácido láctico en determinadas condiciones. [Tanner RS, Miller LM, Yang D: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43: 232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4: 345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. Patente Internacional 2008, WO 2008/028055]. Del mismo modo, en las tres especies se observó la producción de indol. Sin embargo, las especies se diferencian en la utilización de sustrato de varios azúcares (p.ej., ramnosa, arabinosa), ácidos (p.ej., gluconato, citrato), aminoácidos (p.ej., arginina, histidina) u otros sustratos (p.ej., betaína, butanol). Además se observó que algunas de las especies eran auxótrofas para determinadas vitaminas (p.ej., tiamina, biotina) mientras que otras no lo eran.

Las cepas de este grupo se definen por características comunes, al tener tanto un genotipo como un fenotipo similares, y todas comparten el mismo modo de conservación de energía y metabolismo fermentativo. Las cepas de este grupo carecen de citocromos y conservan energía a través de un complejo Rnf.

Todas las cepas de este grupo tiene un tamaño genómico de aproximadamente 4,2 MBp (Köpke *et al.*, 2010) y una composición GC de aproximadamente 32 % mol (Abrini *et al.*, 1994; Köpke *et al.*, 2010; Tanner *et al.*, 1993) (WO 2008/028055; Patente de EE.UU. 2011/0229947) y operones génicos clave esenciales conservados que codifican para enzimas de la ruta Wood-Ljungdahl (monóxido de carbono deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato sintetasa, metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa, formil-tetrahidrofolato ciclohidrolasa, metileno-tetrahidrofolato reductasa y monóxido de carbono deshidrogenasa/Acetil-CoA sintasa), hidrogenasa, formiato deshidrogenasa, complejo Rnf (rnfCDGEAB), piruvato:ferredoxina oxidoreductasa, aldehído:ferredoxina oxidoreductasa (Köpke *et al.*, 2010, 2011). Se ha observado que la organización y el número de genes de la ruta Wood-Ljungdahl, responsable de la captación de gas, son iguales en todas las especies, a pesar de las diferencias en las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos (Köpke *et al.*, 2011).

Se ha demostrado la reducción de ácidos carboxílicos en sus correspondientes alcoholes en un abanico de estos organismos (Perez, Richter, Loftus & Angenent, 2012).

Los rasgos descritos son, por tanto, no específicos de un organismo como *C. autoethanogenum* o *C. ljungdahlii*, sino más bien rasgos generales de las Clostridia carboxidotróficas sintetizadoras de etanol. Por tanto, se puede anticipar que la invención funciona con dichas cepas, aunque puede haber diferencias en los resultados.

Los microorganismos acetogénicos carboxidotróficos recombinantes de la invención se pueden preparar a partir de un microorganismo acetogénico carboxidotrófico progenitor y uno o más ácidos nucleicos exógenos, empleando cualquiera de una serie de técnicas conocidas en el campo para la producción de microorganismos recombinantes. Simplemente a modo de ejemplo, se puede conseguir la transformación (que incluye la transducción o transfección) mediante electroporación, electrofusión, ultrasonificación, transformación mediada por polietileno glicol, conjugación o competencia química y natural. Las técnicas de transformación adecuadas se describen, por ejemplo, en Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989.

- 5 La electroporación ha sido descrita para varios acetógenos carboxidotróficos como *C. ljungdahlii* (Köpke et al., 2010; Leang, Ueki, Nevin, & Lovley, 2012) (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905), *C. autoethanogenum* (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905), *Acetobacterium woodii* (Strätz, Sauer, Kuhn, & Dürre, 1994) o *Moorella thermoacetica* (Kita et al., 2012) y es un método estándar usado en muchas Clostridia tales como *C. acetobutylicum* (Mermelstein, Welker, Bennett, & Papoutsakis, 1992), *C. cellulolyticum* (Jennert, Tardif, Young, & Young, 2000) o *C. thermocellum* (MV Tyurin, Desai, & Lynd, 2004).
- La electrofusión ha sido descrita para Clostridium acetogénica sp. MT351 (Tyurin y Kiriukhin, 2012).
- 10 La inducción de profago ha sido descrita para acetógenos carboxidotróficos, así como en el caso de *C. scatologenes* (Prasanna Tamarapu Parthasarathy, 2010, Development of a Genetic Modification System in Clostridium scatologenes ATCC 25775 for Generelaciónn of Mutants, Masters Project Western Kentucky University).
- La conjugación ha sido descrita como método de elección para el acetógeno *Clostridium difficile* (Herbert, O'Keeffe, Purdy, Elmore, & Minton, 2003) y para muchas otras Clostridia que incluyen *C. acetobutylicum* (Williams, Young, & Young, 1990). En una realización, la cepa progenitora usa CO como única fuente de carbono y energía.
- 15 En una realización el microorganismo progenitor es *Clostridium autoethanogenum* o *Clostridium ljungdahlii*. En una realización particular, el microorganismo es *Clostridium autoethanogenum* DSM23693. En otra realización particular, el microorganismo es *Clostridium ljungdahlii* DSM13528 (o ATCC55383).
- En una realización particular, el microorganismo progenitor es *Clostridium autoethanogenum*, la ruta de biosíntesis es para tiamina o pantotenato y el microorganismo progenitor carece de los genes *thiC* o de uno o más de *panB*, *panC* y *panD*.
- 20 En una realización particular, el microorganismo recombinante se adapta para expresar una o más enzimas en una ruta de biosíntesis de vitaminas que produce una(s) vitamina(s) que es(son) necesaria(s) para el crecimiento del microorganismo y que no se encuentra(n) presente(s) de forma natural en el microorganismo progenitor.
- El microorganismo se puede adaptar para expresar la una o más enzimas a través de una serie de métodos recombinantes que incluyen, por ejemplo, introducir un ácido nucleico exógeno que codifica y está adaptado para expresar una enzima que no está presente de forma natural en el microorganismo progenitor.
- 25 Las vitaminas y enzimas de uso en los microorganismos recombinantes de la invención se definen en otra parte de la presente memoria.
- En una realización, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar una o más de las enzimas referidas en otra parte de la presente memoria. En una realización, los microorganismos comprenden uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar al menos dos de las enzimas. En otras realizaciones, el microorganismo comprende uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican y están adaptados para expresar 3, 4, 5 o 6 de las enzimas.
- 30 El microorganismo puede comprender uno o más ácidos nucleicos exógenos. Cuando es deseable transformar el microorganismo progenitor con dos o más elementos genéticos (por ejemplo) pueden estar contenidos en uno o más ácidos nucleicos exógenos.
- 35 En una realización, el uno o más ácidos nucleicos exógenos es una construcción o vector de ácido nucleico, en una realización particular un plásmido, que codifica una o más de las enzimas referidas en la presente memoria en cualquier combinación.
- 40 Los ácidos nucleicos exógenos pueden permanecer extra-cromosómicos tras la transformación del microorganismo progenitor o preferiblemente se pueden integrar en el genoma del microorganismo progenitor. Por consiguiente, pueden incluir secuencias de nucleótidos adicionales adaptadas para ayudar a la integración (por ejemplo, una región que permite la recombinación homóloga y la integración dirigida en el genoma de hospedante) o la expresión y replicación de una construcción extracromosómica (por ejemplo, origen de replicación, promotor y otros elementos o secuencias reguladores).
- 45 En una descripción, los ácidos nucleicos exógenos que codifican una o más enzimas como se ha mencionado en la presente memoria comprenderán además un promotor adaptado para promover la expresión de la una o más enzimas codificadas por los ácidos nucleicos exógenos. En una descripción, el promotor es un promotor constitutivo que preferiblemente es altamente activo en las condiciones de fermentación apropiadas. También se podrían usar promotores inducibles. En algunas descripciones, el promotor se selecciona del grupo que comprende el grupo
- 50 génico de Wood-Ljungdahl y los promotores de Fosfoacetilasa/Acetato quinasa. Los especialistas en la técnica apreciarán que otros promotores que pueden dirigir la expresión, preferiblemente un nivel elevado de expresión en las condiciones de fermentación apropiadas, serían efectivos como alternativas a los mostrados a modo de ejemplo.
- En una realización, el ácido nucleico exógeno es un plásmido de expresión.

Ácidos nucleicos

También se proporcionan ácidos nucleicos y construcciones de ácido nucleico de uso en la generación de un microorganismo recombinante de la invención.

5 Los ácidos nucleicos comprenden secuencias que codifican una o más enzimas de la ruta de biosíntesis de una o más vitaminas que cuando se expresan en un microorganismo permiten que el microorganismo produzca una vitamina que es necesaria para el crecimiento del microorganismo. En una descripción particular, un ácido nucleico que codifica dos o más enzimas. En una descripción, los ácidos nucleicos codifican 3, 4, 5 o 6 de dichas enzimas.

10 Un ácido nucleico puede codificar una o más enzimas de una ruta de biosíntesis de vitaminas; una o más enzimas de la ruta de biosíntesis de una o más de tiamina, pantotenato, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, biotina, ácido fólico y cianocobalamina; o una o más de las enzimas enumeradas anteriormente en la presente memoria en las tablas 3 a 10.

En una descripción particular, un ácido nucleico codifica una o más enzimas de la ruta de biosíntesis de tiamina; o *ThiC*.

15 En otra descripción, un ácido nucleico codifica una o más enzimas de la ruta de pantotenato; o una o más o todas de *panB*, *panC* o *panD*.

20 Los especialistas en la técnica apreciarán con facilidad secuencias de ácidos nucleicos que codifican las enzimas o las variantes funcionalmente equivalentes de las mismas que son de utilidad, teniendo en consideración la información contenida en la presente memoria, en GenBank y otras bases de datos, y el código genético. Sin embargo, solo a modo de ejemplo, las secuencias de aminoácido y las secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican enzimas de relevancia para la invención se pueden obtener a partir de bases de datos tales como las bases de datos NCBI, KEGG y BRENDA, por ejemplo.

25 Solo a modo de ejemplo, en una realización, *ThiC* tiene la secuencia de SEQ ID No. 3, o es una variante funcionalmente equivalente de la misma. A modo de ejemplo adicional, en una realización, *panB* tiene la secuencia de YP_001309722.1 (GenBank) o es una variante funcionalmente equivalente de la misma, *panC* tiene la secuencia de YP_001309721.1 (GenBank) o es una variante funcionalmente equivalente de la misma y *panD* tiene la secuencia de YP_001309720.1 (GenBank) o es una variante funcionalmente equivalente de la misma.

30 Nuevamente, solo a modo de ejemplo, en una realización, un ácido nucleico que codifica *ThiC* tiene la secuencia de SEQ ID No. 2, o es una variante funcionalmente equivalente de la misma. A modo de ejemplo adicional, en una realización *panB* tiene la secuencia de Cbei_2610; Gene ID: 5293811 o es una variante funcionalmente equivalente de la misma, *panC* tiene la secuencia de Cbei_2609; Gene ID: 5293810 o es una variante funcionalmente equivalente de la misma y *panD* tiene la secuencia de Cbei_2608; Gene ID: 5293809 o es una variante funcionalmente equivalente de la misma.

35 Los ácidos nucleicos de la descripción pueden comprender además un promotor. En una realización, el promotor permite la expresión constitutiva de los genes bajo su control. Sin embargo, también se pueden emplear promotores inducibles. Las personas especialistas en la técnica apreciarán fácilmente promotores de utilidad. Preferiblemente, el promotor puede dirigir un nivel elevado de expresión en las condiciones de fermentación apropiadas. En una descripción particular se usa un promotor del grupo Wood-Ljungdahl. En otra descripción, se usa un promotor de Fosfoacetilasa/Acetato quinasa. En otra descripción un promotor de piruvato:ferredoxina oxidoreductasa, un promotor de operón de complejo Rnf o un promotor de operón de ATP sintasa. En una descripción particular, el promotor procede de *C. autoethanogenum*.

45 Los ácidos nucleicos pueden permanecer extra-cromosómicos tras la transformación de un microorganismo progenitor o preferiblemente pueden adaptarse para integración en el genoma del microorganismo. Por consiguiente, los ácidos nucleicos pueden incluir secuencias de nucleótidos adicionales adaptadas para ayudar en la integración (por ejemplo, una región que permite la recombinación homóloga y la integración dirigida en el genoma hospedante) o la expresión estable y la replicación de una construcción extra-cromosómica (por ejemplo, origen de replicación, promotor y otras secuencias reguladoras).

50 En una descripción, el ácido nucleico es una construcción o un vector de ácido nucleico. En una descripción, la construcción o vector de ácido nucleico es una construcción o un vector de expresión, sin embargo se describen otras construcciones y vectores, tales como los usados para clonación. En una descripción particular, la construcción o vector de expresión es un plásmido.

55 Cabe destacar que una construcción/vector de expresión de la descripción puede contener cualquier número de elementos reguladores además del promotor, así como genes adicionales adecuados para la expresión de proteínas adicionales, si se desea. En una descripción, la construcción/vector de expresión incluye un promotor. En otra descripción, la construcción/vector de expresión incluye dos o más promotores. En una descripción particular, la construcción/vector de expresión incluye un promotor para cada gen a expresar. En una descripción, la

construcción/vector de expresión incluye uno o más sitios de unión ribosómicos, preferiblemente un sitio de unión ribosómico para cada gen que va a ser expresado.

5 Los especialistas en la técnica apreciarán que las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de construcción/vector descritas en la presente memoria pueden contener nucleótidos ligando estándar tales como los requeridos para los sitios de unión de ribosomas y/o los sitios de restricción. Dichas secuencias ligando no deberían ser interpretadas como necesarias, y no suponen una limitación en las secuencias definidas.

10 Los ácidos nucleicos y las construcciones de ácido nucleico, que incluyen las construcciones/vectores de expresión, se pueden construir usando una serie de técnicas estándares en el campo. Por ejemplo, se puede usar síntesis química o técnicas recombinantes. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook et al (Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Otros ejemplos de técnicas se describen en la sección de Ejemplos incluida en la presente memoria más adelante. Esencialmente, los genes individuales y los elementos reguladores serán ligados operativamente unos a otros de tal modo que los genes puedan ser expresados para formar las proteínas deseadas. Los vectores adecuados para su uso serán reconocidos por los especialistas en la técnica. Sin embargo, a modo de ejemplo, los siguientes vectores pueden ser adecuados: vectores pMTL80000, pIMP1, pJIR750 y los plásmidos ejemplificados más adelante en la presente memoria en la sección de Ejemplos.

15 Debería apreciarse que los ácidos nucleicos pueden estar en cualquier forma apropiada, que incluye ARN, ADN o ADNc.

20 También se describen organismos hospedantes, particularmente microorganismos, y que incluyen virus, bacterias y levaduras, que comprenden uno o más de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.

25 El uno o más ácidos nucleicos exógenos pueden administrarse a un microorganismo progenitor como ácidos nucleicos desnudos o pueden formularse con uno o más agentes para facilitar el proceso de transformación (por ejemplo, ácido nucleico conjugado a liposoma, un organismo en el que esté contenido el ácido nucleico). El uno o más ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, o combinaciones de los mismos, según sea apropiado. Se pueden usar inhibidores de restricción, véase, por ejemplo, Murray, N.E. et al. (2000) Microbial. Molec. Biol. Rev. 64, 412.

30 Los microorganismos de la invención pueden prepararse a partir de un microorganismo progenitor y uno o más ácidos nucleicos exógenos usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas en el campo para producir microorganismos recombinantes. Solo a modo de ejemplo, la transformación (que incluye transducción o transfección) se puede lograr mediante electroporación, ultrasonificación, transformación mediada por polietilén glicol, competencia química o natural, o conjugación. Las técnicas de transformación adecuadas se describen, por ejemplo, en Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Labrotary Press, Cold Spring Harbour, 1989.

35 En determinadas realizaciones, debido a los sistemas de restricción que están activos en los microorganismos que van a ser transformados, es necesario metilar el ácido nucleico que va a ser introducido en el microorganismo. Esto puede llevarse a cabo usando una variedad de técnicas, que incluyen aquellas descritas a continuación, y que se ejemplifican adicionalmente en la sección de Ejemplos incluida más adelante en la presente memoria.

A modo de ejemplo, en una realización, un microorganismo recombinante de la invención es producido mediante un método que comprende las siguientes etapas:

40 a. introducción en un microorganismo lanzadera de(i) una construcción/vector de expresión como los descritos en la presente memoria, y (ii) una construcción/vector de metilación que comprende un gen de metiltransferasa; expresión del gen de metiltransferasa;

b. aislamiento de una o más construcciones/vectores del microorganismo lanzadera; y,

c. introducción de la una o más construcciones/vectores en un microorganismo de destino.

45 En una descripción, el gen de metiltransferasa de la etapa B es expresado constitutivamente. En otra descripción, se induce la expresión del gen de metiltransferasa de la etapa B.

El microorganismo lanzadera es un microorganismo, preferiblemente un microorganismo negativo de restricción, que facilita la metilación de las secuencias de ácido nucleico que constituyen la construcción/vector de expresión. En una descripción particular, el microorganismo lanzadera es *E. coli*, *Bacillus subtilis* o *Lactococcus lactis* negativos de restricción.

50 La construcción/vector de metilación comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una metiltransferasa.

Una vez que la construcción/vector de expresión y la construcción/vector de metilación han sido introducidos en el microorganismo lanzadera, se induce el gen de metiltransferasa presente en la construcción/vector de metilación. La inducción puede ser cualquier sistema promotor adecuado, aunque en una descripción particular, la construcción/vector de metilación comprende un promotor lac inducible y es inducido mediante adición de lactosa o

un análogo de la misma, más preferiblemente isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG). Otros promotores adecuados incluyen el sistema ara, tet o T7. En una descripción adicional, el promotor de la construcción/vector de metilación es un promotor constitutivo.

5 En una descripción particular, la construcción/vector de metilación tiene un origen de replicación específico para la identidad del microorganismo lanzadera, de tal modo que cualesquier genes presentes en la construcción/vector de metilación son expresados en el microorganismo lanzadera. Preferiblemente, la construcción/vector de expresión tiene un origen de replicación específico de la identidad del microorganismo de destino, de tal modo que cualesquier genes presentes en la construcción/vector de expresión son expresados en el microorganismo de destino.

10 La expresión de la enzima metiltransferasa da como resultado la metilación de los genes presentes en la construcción/vector de expresión. La construcción/vector de expresión puede aislarse entonces del microorganismo lanzadera según uno cualquiera de una serie de métodos conocidos. Solo a modo de ejemplo, la metodología descrita más adelante en la sección de Ejemplos puede usarse para aislar la construcción/vector de expresión.

En una descripción particular, ambas construcciones/vectores son aislados simultáneamente.

15 La construcción/vector de expresión puede introducirse en el microorganismo de destino usando cualquier número de métodos conocidos. Sin embargo, a modo de ejemplo, se puede usar la metodología descrita más adelante en la sección de Ejemplos. Puesto que la construcción/vector de expresión está metilado, las secuencias de ácido nucleico presentes en la construcción/vector de expresión son capaces de incorporarse al microorganismo de destino y de expresarse con éxito.

20 Se contempla que un gen de metiltransferasa se puede introducir en un microorganismo lanzadera y sobre-expresarse. De esta manera, en una descripción, la enzima metiltransferasa resultante puede recolectarse usando métodos conocidos y usarse *in vitro* para metilar un plásmido de expresión. La construcción/vector de expresión de puede introducir entonces en el microorganismo de destino para expresión. En otra descripción, el gen de metiltransferasa es introducido en el genoma del microorganismo lanzadera seguido de la introducción de la construcción/vector de expresión en el microorganismo lanzadera, el aislamiento de una o más construcciones/vectores del microorganismo lanzadera y a continuación la introducción de la construcción/vector de expresión en el microorganismo de destino.

25 Se contempla que la construcción/vector de expresión y la construcción/vector de metilación según se han definido anteriormente puedan combinarse para proporcionar una composición de materia. Dicha composición tiene utilidad particular para solventar los mecanismos de barrera de restricción para producir los microorganismos recombinantes de la invención.

30 En una descripción particular, la construcción/vector de expresión y/o la construcción/vector de metilación son plásmidos.

35 Las personas especialistas en la técnica apreciarán una serie de metiltransferasas adecuadas con utilidad para producir los microorganismos de la invención. Sin embargo, a modo de ejemplo se puede usar la fago ΦT1 metiltransferasa de *Bacillus subtilis* y una metiltransferasa que tenga la secuencia de SEQ ID No. 14, o una variante funcionalmente equivalente de la misma. Se apreciarán rápidamente los ácidos nucleicos que codifican metiltransferasas adecuadas en base a la secuencia de la metiltransferasa deseada y el código genético. En una descripción, el ácido nucleico que codifica una metiltransferasa es como la SEQ ID No. 15 o es una variante funcionalmente equivalente de la misma.

40 Se puede usar cualquier número de construcciones/vectores adaptados para permitir la expresión de un gen de metiltransferasa para generar la construcción/vector de metilación. Sin embargo, a modo de ejemplo, se puede usar el plásmido descrito en la sección de Ejemplos más adelante.

Métodos de producción

45 La invención proporciona un método para la producción de uno o más productos deseables mediante fermentación microbiana de un sustrato usando un microorganismo recombinante de la invención.

50 Para la fermentación se puede usar cualquier sustrato que sea apropiado para fermentación anaeróbica, que incluye, por ejemplo, carbohidratos, azúcares, sustratos que comprenden CO, sustratos que comprenden dióxido de carbono e hidrógeno, glicerol, ácidos grasos, almidón, melazas, azúcares de tipo pentosa y hexosa, biomasa. En una realización, el sustrato es un sustrato que comprende CO. En dicha realización, los métodos de la invención se pueden usar para reducir las emisiones totales de carbono a la atmósfera procedentes de un proceso industrial.

Preferiblemente, la fermentación comprende las etapas de fermentar un sustrato en un biorreactor para producir el uno o más productos usando un microorganismo recombinante de la invención.

En una realización, el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sustrato a un biorreactor que contiene un cultivo de uno o más microorganismos de la invención; y

(b) fermentación anaeróbica del cultivo en el biorreactor para producir el uno o más productos.

En una realización el método comprende las etapas de:

5 (a) capturar un gas que contiene CO producido como resultado del proceso industrial, antes de que el gas sea liberado a la atmósfera.

(b) la fermentación anaeróbica del gas que contiene CO para producir el uno o más productos mediante un cultivo que contiene uno o más microorganismos de la invención.

10 En una realización de la invención, el sustrato gaseoso fermentado por el microorganismo es un sustrato gaseoso que contiene CO. El sustrato gaseoso puede ser un gas residual que contiene CO obtenido como sub-producto de un proceso industrial, o procedente de alguna otra fuente tal como de gases de escape de automóvil. En determinadas realizaciones, el proceso industrial se selecciona del grupo que consiste en fabricación de productos metálicos féreos, tal como una acería, fabricación de productos no féreos, procesos de refinado de petróleo, gasificación de carbón, producción de electricidad, producción de negro de humo, producción de amoníaco, producción de metanol y fabricación de coque. En estas realizaciones, el gas que contiene CO puede ser capturado del proceso industrial antes de ser emitido a la atmósfera, usando cualquier método conveniente. El CO puede ser un componente de gas de síntesis (gas que comprende monóxido de carbono e hidrógeno). El CO producido a partir de procesos industriales normalmente es llevado a antorcha para producir CO₂ y por tanto la invención presenta una utilidad particular para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero de CO₂ y producir butanol para uso como biocombustible. Dependiendo de la composición del sustrato gaseoso que contiene CO, también puede ser deseable tratarlo para eliminar cualesquier impurezas no deseadas, tales como partículas de polvo, antes de introducirlo a la fermentación. Por ejemplo, el sustrato gaseoso puede filtrarse o lavarse usando métodos conocidos.

25 Se apreciará que para que se produzca el crecimiento de las bacterias y el sustrato para producir el uno o más producto(s), además del sustrato, será necesario alimentar al biorreactor un medio nutriente líquido adecuado. El sustrato y el medio se pueden alimentar al biorreactor de un modo continuo, por cargas o semi-continuo. Un medio nutriente contendrá una serie de compuestos suficientes para permitir la supervivencia y/o el crecimiento del microorganismo usado, como es conocido en la técnica. Los medios de fermentación anaeróbicos y aeróbicos adecuados son conocidos en la técnica. Por ejemplo, medios adecuados son los descritos por Biebel (2001). Sin embargo, la presente invención ofrece la ventaja de no tener que incluir en el medio una o más vitaminas, ya que el microorganismo recombinante es capaz de producirla. Por consiguiente, se puede usar un medio mínimo, reduciendo costes. Adicionalmente, el crecimiento y la fermentación de microorganismos recombinantes típicamente implican la adición al medio de un compuesto de selección, típicamente uno o más antibióticos, de tal modo que el microorganismo recombinante es seleccionado y cualesquier microorganismos contaminantes no sobreviven. El uso de antibióticos aumenta el coste de la fermentación, y puede haber otros inconvenientes tales como toxicidad. La presente invención obvia la necesidad de antibióticos. En una realización de la invención el medio es como se describe en la presente memoria más adelante en la sección de Ejemplos.

40 La fermentación debería llevarse a cabo de forma deseable en las condiciones apropiadas para que se produzca la fermentación del sustrato en el uno o más producto(s). Las condiciones de reacción que deberían considerarse incluyen presión, temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, pH del medio, potencial redox del medio, velocidad de agitación (si se usa un reactor continuo de tanque agitado), nivel de inóculo, concentraciones de sustrato máximas para asegurar que no se vuelve limitante, y concentraciones de producto máximas para evitar inhibición de producto.

45 Cuando se usa un sustrato que comprende CO, a menudo es deseable aumentar la concentración de CO de la corriente de sustrato (o la presión parcial de sustrato en un sustrato gaseoso) y de este modo incrementar la eficacia de las reacciones de fermentación en las que el CO es un sustrato. Operar en condiciones de presión elevada permite aumentar significativamente la velocidad de la transferencia de CO desde la fase gas hasta la fase líquida, en la que puede ser captado por el micro-organismo como fuente de carbono para la producción del uno o más producto(s). Esto a su vez significa que el tiempo de retención (definido como el volumen líquido del biorreactor dividido por el caudal de gas de entrada) se puede reducir cuando los biorreactores se mantienen a una presión elevada en lugar de a presión atmosférica. Las condiciones de reacción óptimas dependerán parcialmente del micro-organismo particular de la invención usado. Sin embargo, en general, se prefiere que la fermentación se lleve a cabo a una presión superior a la presión ambiental. Asimismo, puesto que una velocidad de conversión dada de CO en el uno o más producto(s) es en parte función del tiempo de retención del sustrato, y el alcanzar un tiempo de retención deseado a su vez dicta el volumen de biorreactor requerido, el uso de sistemas presurizados puede reducir enormemente el volumen de biorreactor requerido, y en consecuencia el coste de inmovilizado del equipamiento de fermentación. Según los ejemplos proporcionados en la Patente de EE.UU. nº 5.593.886, el volumen del reactor se puede reducir en una proporción lineal con respecto al aumento de la presión de operación del reactor, es decir, biorreactores operados a 10 atmósferas de presión solo necesitan una décima parte del volumen de los operados a 1 atmósfera de presión.

A modo de ejemplo, se han descrito los beneficios de llevar a cabo la fermentación de gas-a-etanol a presiones elevadas. Por ejemplo, el documento WO 02/08438 describe fermentaciones gas-a-etanol llevadas a cabo a presiones de 30 psi (2,07 bar) y 75 psi (5,17 bar) dando lugar a productividades de etanol de 150 g/L·día y 369 g/L·día, respectivamente. Sin embargo, en ejemplos de fermentaciones llevadas a cabo usando medios y composiciones de gas de entrada similares a presión atmosférica se observó que la producción de etanol era de 10 y 20 veces menor por litro y día.

También es deseable que la velocidad de introducción del sustrato gaseoso que contiene CO sea tal que asegure que la concentración de CO en la fase líquida no sea limitante. Esto es porque una consecuencia de unas condiciones limitadas por CO puede ser que el producto sea consumido por el cultivo.

La composición de las corrientes de gas usadas para alimentar una reacción de fermentación puede tener un impacto significativo en la eficacia y/o los costes de dicha reacción. Por ejemplo, el O₂ puede reducir la eficacia de un proceso de fermentación anaeróbico. El procesado de gases no deseado o innecesario en etapas de un proceso de fermentación antes o después de la fermentación puede incrementar la carga de dichas etapas (p.ej., cuando la corriente de gas es comprimida antes de entrar a un biorreactor, puede usarse una energía innecesaria para comprimir gases que no son necesarios para la fermentación). Por consiguiente, puede ser deseable tratar corrientes de sustrato, particularmente corrientes de sustrato derivadas de fuentes industriales, para eliminar los componentes no deseados y aumentar la concentración de los componentes deseados.

En determinadas realizaciones un cultivo de una bacteria de la invención es mantenido en un medio de cultivo acuoso (que no incluye una o más vitaminas según la invención). Preferiblemente, el medio de cultivo acuoso es un medio de crecimiento microbiano mínimo. Los medios adecuados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. nº 5.173.429 y 5.593.886 y en el documento WO 02/08438, y tal como se describe en la sección de Ejemplos incluida más adelante en la presente memoria.

El uno o más productos pueden recuperarse del caldo de fermentación mediante métodos conocidos en la técnica, tal como destilación fraccional o evaporación, pervaporación, desabsorción de gas y fermentación extractiva, que incluye, por ejemplo, extracción líquido-líquido.

El uno o más productos pueden recuperarse del caldo de fermentación eliminando continuamente una porción del caldo del biorreactor, separando células microbianas del caldo (de forma conveniente por filtración), y recuperando uno o más productos del caldo. Los alcoholes se pueden recuperar convenientemente mediante destilación, por ejemplo. La acetona se puede recuperar, por ejemplo, mediante destilación. Cualesquier ácidos se pueden recuperar convenientemente por adsorción sobre carbón vegetal activado. Las células microbianas separadas preferiblemente se devuelven al biorreactor de fermentación. El permeado libre de células que queda después de cualquier alcohol(es) y ácido(s) ha sido retirado también es devuelto preferiblemente al biorreactor de fermentación.

Las vitaminas se pueden recuperar usando cualquier medio apropiado. Sin embargo, a modo de ejemplo, se pueden recuperar por concentración y secado de las células (p.ej., centrifugación o secado por pulverización) con extracción posterior (p.ej., en alcohol con purificación y filtración usando cromatografía o simplemente por centrifugación diferencial) y cristalización (Survase et al., 2006, Food Technol. Biotechnol. 44: 381-96).

En una descripción, el uno o más productos (en una descripción particular, una o más vitaminas) se recupera de la fermentación y se hace pasar a uno o más biorreactores adicionales para ayudar en el crecimiento de uno o más microorganismos adicionales, o para ayudar en la fermentación de un sustrato por parte de los mismos.

En una descripción, el uno o más microorganismos adicionales es un microorganismo que es incapaz de producir, o incapaz de producir en un nivel suficiente, la una o más vitamina(s) y que requiere que su medio de crecimiento o fermentación sea suplementado con la una o más vitamina(s) para asegurar o mantener el crecimiento o la fermentación, o para aumentar la eficacia de crecimiento o de fermentación.

El uno o más producto(s) recuperado(s) de la primera fermentación se hace(n) pasar a uno o más biorreactores adicionales usando cualquier conducto adecuado.

Los métodos pueden comprender además la fermentación de un sustrato por parte del uno o más microorganismos adicionales para producir uno o más productos. El uno o más productos pueden recuperarse a continuación a partir del caldo de fermentación.

Métodos de selección

También se describe un método para la selección de un microorganismo A en una población mixta de microorganismos, en donde el microorganismo A es un microorganismo recombinante que comprende al menos un ácido nucleico exógeno y que está adaptado para expresar una o más enzimas en la ruta de biosíntesis de una o más vitaminas que produce una o más vitamina(s) que son necesarias para el crecimiento de la población mixta de microorganismos.

El método comprende someter a la población mixta de microorganismos a condiciones de cultivo que incluyen un medio que carece de una o más vitamina(s) que son necesarias para el crecimiento de los microorganismos. Aquellos microorganismos que no sean capaces de producir la una o más vitamina(s), no crecerán o serán seleccionadas en contra.

- 5 En otras descripciones, la una o más enzimas son como se ha descrito aquí anteriormente. La una o más vitaminas son como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. En una descripción particular, la una o más vitaminas son elegidas entre tiamina, pantotenato, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, biotina, ácido fólico y/o cianocobalamina.

- 10 Las “condiciones de cultivo” pueden ser cualesquier condiciones adecuadas que permitan al menos mantener un cultivo del microorganismo A e incluyen las condiciones adecuadas para el crecimiento y/o la fermentación. Los especialistas apreciarán las condiciones adecuadas, teniendo en cuenta la naturaleza del microorganismo, y la información contenida en la presente memoria. Sin embargo, a modo de ejemplo, las condiciones de crecimiento incluyen condiciones ambientales adecuadas, que incluyen pH, presencia o ausencia de oxígeno y otros gases, salinidad, temperatura y similares.

- 15 Se puede usar cualquier medio adecuado, siempre que carezca de la una o más vitaminas necesarias para el crecimiento de los microorganismos (que pueden ser producidas por el microorganismo A) tal como se ha descrito previamente en la presente memoria. Los especialistas en la técnica apreciarán fácilmente una variedad de medios apropiados. Sin embargo, en una descripción, el medio es un medio mínimo.

- 20 Aunque la invención soluciona la necesidad de usar medios de selección alternativos o medios suplementados con ingredientes tales como antibióticos, estos métodos podrían combinarse con la presente invención si se desea.

El método de este aspecto de la invención puede ser útil para distinguir entre microorganismos recombinantes y no recombinantes durante el proceso de producción de microorganismos recombinantes – por ejemplo, distinguir con éxito bacterias transformadas durante un proceso de transformación.

- 25 El método también puede ser útil para el propósito de seleccionar contra microorganismo contaminantes durante el cultivo de laboratorio o de escala comercial de microorganismos y/o reacciones de fermentación. Sin medidas de selección, los microorganismos no deseados pueden crecer en detrimento de un microorganismo deseado, o afectar de cualquier otro modo a la eficacia del cultivo o de la reacción de fermentación.

- 30 Por consiguiente, la invención también proporciona un medio para prevenir el crecimiento de uno o más microorganismos no deseados en un cultivo microbiano o un caldo de fermentación, en donde el cultivo microbiano o caldo de fermentación comprende el microorganismo A y un medio nutriente, en donde el microorganismo A es un microorganismo recombinante que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que está adaptado para expresar una o más enzimas en una o más rutas biosintéticas de vitaminas que producen una o más vitamina(s) que son necesarias para el crecimiento del microorganismo A y el microorganismo(s) no deseado(s) de tal modo que el microorganismo A puede producir la una o más vitamina(s), en donde el medio carece de una o más vitamina(s).

- 35 También se describe un método para el crecimiento o cultivo selectivo de un microorganismo A, y en donde el microorganismo A es un microorganismo recombinante que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que está adaptado para expresar una o más enzimas en una o más rutas biosintéticas de vitaminas que produce una o más vitamina(s) que son necesarias para el crecimiento del microorganismo, de tal modo que el microorganismo A puede producir la una o más vitamina(s), y en donde el medio de crecimiento o cultivo carece de una o más vitamina(s).

- 40 En una descripción, las condiciones seleccionan contra el crecimiento de uno o más microorganismo(s) no deseado(s).

- 45 También se describe un método para la producción de uno o más productos mediante fermentación microbiana de un sustrato por un microorganismo A, en donde el microorganismo A es un microorganismo recombinante que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que está adaptado para expresar una o más enzimas en una o más rutas biosintéticas de vitamina que producen una o más vitamina(s) que son necesarias para el crecimiento del microorganismo, de tal modo que el microorganismo A pueden producir la una o más vitamina(s), y en donde la fermentación se produce en un medio de cultivo, o sobre él, que carece de una o más vitamina(s).

- 50 En una descripción, las condiciones seleccionan para el crecimiento del microorganismo A y contra el crecimiento de uno o más microorganismo(s) no deseado(s).

Debería apreciarse que los microorganismos, que incluyen el microorganismo recombinante A, pueden elegirse entre cualquier microorganismo de interés, y no están limitados a anaerobios. Sin embargo, en una descripción pueden elegirse del grupo de microorganismos anaeróbicos. En una realización, se eligen del grupo de acetógenos carboxidotróficos.

Los métodos descritos en la presente memoria para producir los microorganismos recombinantes anaeróbicos, así como los métodos conocidos en la técnica, pueden emplearse fácilmente para generar los microorganismos recombinantes a seleccionar, ajustarse para adecuarse a un microorganismo particular cuando sea necesario. Por ejemplo, cuando el microorganismo no es un anaerobio, se pueden usar condiciones aeróbicas. El microorganismo progenitor puede elegirse entre cualquier clase de microorganismos, y no se limita a anaerobios. Sin embargo, en una descripción se pueden elegir del grupo de microorganismos anaeróbicos y en una realización particular acetógenos carboxidotróficos.

De forma similar, los métodos para el crecimiento y fermentación descritos se pueden emplear, ajustando las condiciones, según sea necesario para el tipo de microorganismo de interés; por ejemplo, sustituyendo condiciones anaeróbicas por aeróbicas.

También se describen microorganismos cultivados o crecidos según un método descrito previamente en la presente memoria, y los productos producidos mediante un método descrito previamente en la presente memoria.

Ejemplos

La invención se describirá ahora más detalladamente en referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Métodos

Análisis de las rutas de biosíntesis de vitaminas de *Clostridium ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* y *C. ragsdalei*

Los inventores analizaron los genomas de los acetógenos carboxidotróficos *Clostridium ljungdahlii* (NC_014328.1; Köpke et al., 2010, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 107: 13087-13092), *C. autoethanogenum* y *C. ragsdalei*. Se observó que tanto *C. ljungdahlii* como *C. autoethanogenum* son incapaces de sintetizar tiamina debido a la falta de la proteína de biosíntesis de tiamina ThiC que participa en la formación de 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina a partir de 1-(5'-fosforibosil)-5-aminoimidazol ribonucleótido (AIR). El ThiC es el único producto génico requerido que ha sido identificado para la biosíntesis de pirimidina en *E. coli*, *S. typhimurium* y *B. subtilis* (Begeley et al, 1999, Arch Microbiol, 171: 293-300). Por otro lado, ThiC y la ruta de biosíntesis de tiamina completa están presentes en *C. ragsdalei* y otros organismos. La auxotrofia de tiamina de *C. ljungdahlii* y *C. autoethanogenum* fue demostrada en botellas de suero y en experimentos de fermentación, confirmando que es necesario añadir tiamina al medio de fermentación (ver más adelante).

Se observó que la ruta de biosíntesis de pantotenato/CoA está incompleta en los tres organismos, *Clostridium ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* y *C. ragsdalei*, debido a la falta de los genes biosintéticos *panBCD*, que codifican una 3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferasa (EC:2.1.2.11; que cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato y ácido 3-metil-2-oxobutanoico en tetrahidrofolato y 2-deshidropantoato), pantoato-beta-alanina ligasa (EC:6.3.2.1; que cataliza la reacción de (R)-pantoato + beta-alanina en difosfato + pantotenato), y aspartato 1-descarboxilasa (EC:4.1.1.11; que cataliza la conversión de L-aspartato en beta-alanina).

Este concepto se puede extender a otras especies de *Clostridium*, que incluyen especies clostridiales no acetogénicas u otras especies acetogénicas. Los genomas se pueden obtener en fuentes públicas tales como NCBI (/genoma/browse/) o KEGG (genoma.jp/kegg-bin/get_htext) y a continuación ser analizados para determinar la presencia de genes que codifican las proteínas de biosíntesis de vitaminas enumeradas en las tablas 1-8. Por ejemplo, se observó que los genes *panCD* también faltan en otro acetógeno carboxidotrófico, *Acetobacterium woodii*, que ha sido secuenciado recientemente (Poehlein et al., 2012) o que los genes *panBCD* faltan en otras especies de *Clostridia* tales como *C. phytofermentans*, mientras que los demás genes de la ruta del pantotenato están presentes.

Experimentos de crecimiento con *Clostridium ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* y *C. ragsdalei* en medio sin tiamina

Se llevaron a cabo experimentos usando *C. autoethanogenum* DSM10061 y DSM23693 (un derivado de DSM10061) y *C. ljungdahlii* obtenidos de DSMZ (la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania). El *C. ragsdalei* ATCC BAA-622 se obtuvo de ATCC ("American Type Culture Collection", Manassas, VA 20108, EE.UU.).

Todas las cepas fueron cultivadas a 37°C en medio PETC definido químicamente sin extracto de levadura (Tabla 9) usando condiciones y técnicas estrictamente anaeróbicas (Hungate, 1969, Methods in Microbiology, vol. 3B. Academic Press, Nueva York: 117-132; Wolfe, 1971, Adv. Microb. Physiol., 6: 107-146). Como única fuente de carbono y de energía se utilizó gas residual de acería a 2,07 bar (30 psi) que contenía monóxido de carbono (recogido en las instalaciones de "New Zealand Steel" en Glenbrook, NZ; composición: 44% CO, 32% N₂, 22% CO₂, 2% H₂).

ES 2 661 953 T3

Tabla. 9: Medio PETC

Componente del medio	Concentración por 1,0 L de medio
NH ₄ Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
CaCl ₂	0,02 g
Disolución de metales traza	10 ml
Disolución de vitaminas de Wolfe menos tiamina	10 ml
Resazurina (reserva de 2 g/L)	0,5 ml
NaHCO ₃	2 g
Agente reductor	0,006-0,008 % (v/v)
Agua destilada	Hasta 1 L, pH 5,5 (ajustado con HCl)
Disolución de vitaminas de Wolfe menos tiamina	por L de reserva
Biotina	2 mg
Ácido fólico	2 mg
Hidrocloruro de piridoxina	10 mg
Riboflavina	5 mg
Ácido nicotínico	5 mg
D-(+)-pantotenato cálcico	5 mg
Vitamina B ₁₂	0,1 mg
Ácido p-aminobenzoico	5 mg
Ácido lipoico	5 mg
Tiamina	5 mg
Agua destilada	Hasta 1 L
Disolución de metales traza	por L de reserva

Disolución de metales traza	por L de reserva
Ácido nitrilotriacético	2 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	1 g
Fe (SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ ·6H ₂ O	0,8 g
COCl ₂ ·6H ₂ O	0,2 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,02 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,02 g
Na ₂ SeO ₃	0,02 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,02 g
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0,02 g
Agua destilada	Hasta 1 L
Reserva de agente reductor	por 100 mL de reserva
NaOH	0,9 g
Cisteína·HCl	4 g
Na ₂ S	4 g
Agua destilada	Hasta 100 mL

A continuación se llevaron a cabo experimentos de crecimiento en medio PETC omitiendo tiamina (o pantotenato) de la disolución de vitaminas de Wolf. Mientras que *C. ragsdalei* fue capaz de crecer sobre múltiples subcultivos en ausencia de tiamina, *C. autoethanogenum* y *C. ljungdahlii* fueron incapaces de crecer por más de 2 etapas de subcultivo en ausencia de tiamina (o en ninguna etapa de subcultivo, si la célula era lavada antes de la inoculación para eliminar la tiamina residual), confirmando los resultados del análisis de genoma de que dichas cepas son auxótrofas para tiamina.

Para *C. autoethanogenum* DSM23693, también se llevó a cabo un experimento en biorreactor, usando un medio definido que contenía por litro: MgCl, CaCl₂ (0,5 mM), KCl (2 mM), H₃PO₄ (5 mM), Fe (100 μM), Ni, Zn (5 μM), Mn, B, W, Mo, Se (2 μM) se preparó para el crecimiento de cultivo. El medio se transfirió al biorreactor y se autoclavó a 121°C durante 45 minutos. Tras el autoclavado, el medio se suplementó con disolución de vitamina B de Wolfe (ver más arriba) y se redujo con Cisteína-HCl 3 mM. Para alcanzar el estado anaeróbico, el recipiente de reacción fue purgado con nitrógeno a través de un filtro de 0,2 μm. El caudal de gas residual de acería que contenía monóxido de carbono fue fijado inicialmente a 80 mL/min, aumentando a 120 mL/min durante la fase media exponencial, mientras que la agitación se incrementó de 250 rpm a 350. Se dosificó Na₂S en el biorreactor a 0,25 mL/h. Una vez que la DO600 alcanzó 0,4, el biorreactor se cambió a un modo continuo con un caudal de 1,0 mL/min (velocidad de dilución 0,96 d⁻¹). Se dosificó tiamina en el reactor por separado usando una bomba de jeringa. La bomba de tiamina se apagó durante seis días entre el día veinte y el veintiséis. Durante el periodo, se detuvo la alimentación de tiamina, el cultivo murió y la biomasa y la captación de gas cayeron considerablemente. El reinicio de la alimentación de tiamina regeneró el crecimiento y la biomasa y la captación de gas retornaron a los mismos niveles de antes (Figura 1), demostrando que *C. autoethanogenum* es auxótrofo para tiamina, como era de esperar por los experimentos en botella de suero y por los análisis de genoma.

Clonación del gen de biosíntesis de tiamina thiC

El gen *thiC* de *Clostridium ragsdalei* se clonó en un vector apropiado para expresión. En esta invención se usaron técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular estándares (Sambrook et al, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Labrotary Press, Cold Spring Harbour, 1989; Ausubel et al, Current protocols en Molecular Biology, John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 1987).

5 Para la extracción de ADN genómico de *C. ragsdalei* y *C. autoethanogenum*, se cosechó un cultivo en crecimiento exponencial de 100 mL (4000 x g, 15 min, 4°C), se lavó con tampón de fosfato potásico (10 mM, pH 7,5) y se re-suspendió en 1,9 mL de tampón STE (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, sacarosa 200 mM). Las células fueron incubadas durante 30 minutos con 300 µL de lisozima (100 000 U) a 37°C. La etapa de lisis vino seguida de una incubación de 10 minutos con SDS al 10% (p/v). El ARN fue digerido a temperatura ambiente mediante la adición de
10 240 µL de EDTA 0,5 M (pH 8,0), 20 µL de Tris-HCl 1 M (pH 7,5), y 100 µL de ARNasa A. A continuación se añadieron 100 µL de Proteinasa K (0,5 U) y la proteólisis tuvo lugar durante 3 h a 37°C. Finalmente, se añadieron 600 µL de perclorato sódico (5 M), seguido de una extracción de fenol-cloroformo y una precipitación en isopropanol.

Una región (SEQ ID NO: 1) del genoma de *C. ragsdalei* que contenía el gen *thiC* (SEQ ID NO: 2), así como los genes *purF* adyacentes (SEQ ID NO: 4 y 6) que codifican una amidofosforribosil transferasa (SEQ ID NO: 5 y 7) y la región promotora que incluye el elemento de caja *thi* regulador (Figura 2) usando los oligonucleótidos *ThiC*-*Apal*-*F* (SEQ ID NO: 8: GCAGGGCCCAATACGATTATCTCCTTTC) y *ThiC*+*PurF*-*Rev*-*Sbfl* (SEQ ID NO: 9: GCATCCTGCAGGTAATTTTGTTCCTTCATT) pedidos a Life Technologies. La inclusión del *PurF* puede no ser necesaria, ya que tanto *C. autoethanogenum* como *C. ljungdahlii* contienen un gen *purF*.
15

La amplificación se llevó a cabo en un sistema GeneAmp PCR 9700 de Applied Biosystems, usando *iProof* HF ADN polimerasa (Bio-Rad) y tampón *FailSafe* 2X PCR premix E (Epicentre). Los genes fueron amplificados usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 98°C durante dos minutos, seguido de treinta y dos ciclos de desnaturalización (95°C durante 30 s), maduración (53°C durante 30 s) y extensión (68°C durante 3 minutos). Una etapa de extensión final de cinco minutos a 72°C completó la amplificación del fragmento de 3063 pb.
20

El fragmento de PCR obtenido se clonó en el vector lanzadera pMTL85246 (SEQ ID NO: 10) usando *Apal* y *Sbfl* (New England Biolabs) para crear el plásmido pMTL85246-*thiC*-*purF* (SEQ ID NO: 11, Figura 3). El vector pMTL85246 es un derivado del pMTL85240 con la región promotora de operón *pta*-*ack* de fosfotransacetilasa-acetasa quinasa de *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO: 12) clonado vía *NotI* y *NdeI*.
25

Los fragmentos de ADN fueron incubados con *Apal* y BSA a 25°C durante tres horas, seguido de adición de *Sbfl* e incubación a 37°C durante otras tres horas. Se llevó a cabo una doble digestión a 37°C para *NotI* y *NdeI*. Todas las enzimas fueron inactivadas mediante una incubación de veinte minutos a 65°C. Los vectores pMTL85240 y pMTL85246 fueron desfosforilados usando fosfatasa alcalina de langostino (Fermentas) a 37°C durante una hora. Los fragmentos de ADN purificados fueron ligados con ADN ligasa T4 (New England Biolabs). La reacción se dejó incubando a 16°C durante una noche y la enzima fue inactivada con una incubación de diez minutos a 65°C.
30

Se transformaron 5 µL de la mezcla de ligación en células electro-competentes de una cepa negativa para *thiC* de *E. coli* JW3958-1 [*thiC765*(del)::kan (Baba et al, 2006, Mol. Syst. Biol., 2: 1-11)] obtenida del "Coli Genetic Stock Centre" (CGSC). Tras regeneración en medio LB durante 30 minutos, las células fueron lavadas dos veces y se llevó a cabo la selección usando el gen *thiC* como marcador seleccionable en medio M9 (Tabla 10) sin tiamina. La formación de colonias necesito 2-3 días, y todas las colonias cribadas fueron positivas, sin ningún crecimiento de fondo. Esto es importante cuando se usa como marcador seleccionable y fue facilitado sorprendentemente por el tratamiento especial de las células, tal como el lavado de las células después de la regeneración. Cuando se expresó el gen *thiC* de planta usando un marcador seleccionable de antibiótico en *E. coli*, se observó un crecimiento de fondo significativo (Kong et al., 2008, Cell Research 18: 566-576).
35 40

La presencia del plásmido fue confirmada usando PCR de colonia (Intron *iTaq* PCR premix). Las condiciones de PCR fueron: 94°C durante tres minutos, seguido de treinta y dos ciclos de desnaturalización (94°C durante 30 segundos), maduración (53°C durante 30 s) y extensión (72°C durante 3 minutos). Una etapa de extensión final de siete minutos a 72°C completó la amplificación del fragmento de 3063 pb. La presencia del inserto y el plásmido también fue confirmada usando digestión de restricción con *NdeI* (NEB) dando dos bandas (4269 pb y 2325 pb). El inserto del plásmido fue secuenciado completamente para confirmar la identidad de secuencia.
45

Tabla 10. Medio mínimo M9.

Componente del medio	Concentración por 1,0 L de medio
Sales M9 (ver debajo)	200 ml
MgSO ₄ 1 M	2 ml
glucosa al 20%	20 ml

Componente del medio	Concentración por 1,0 L de medio
1M CaCl ₂	100 µl
Agua destilada	Hasta 1 L
Sales M9	por L de reserva 48
Na ₂ HPO ₄	64 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2,5 g
NH ₄ Cl	5 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Uso de *thiC* como marcador seleccionable en *C. autoethanogenum*

Antes de la transformación en *C. autoethanogenum*, el ADN plásmido fue metilado *in vivo* usando la cepa de *E. coli* XL1Blue MRF' y el plásmido de metilación pGS20 (SEQ ID NO: 13) que porta una metiltransferasa diseñada (SEQ ID NO: 14) bajo el control de un promotor lac inducible (SEQ ID NO: 15) tal como se describe en la patente mundial WO 2012/053905. El ADN plásmido metilado fue purificado usando el Kit de purificación de plásmido PureLink™ HiPure (Life Technologies). Las células estaban creciendo en medio PET (Tabla 9) con tiamina más 1 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de fructosa más gas de acería como fuente de carbono y energía. Se subcultivó un cultivo de 50 mL de *C. autoethanogenum* DSM23693 con medio fresco durante 3 días consecutivos. Estas células fueron usadas para inocular 50 mL de medio PETC que contenía DL-treonina 40 mM a una DO_{600nm} de 0,05. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,4, las células fueron transferidas a una cámara anaeróbica y recolectadas a 4.700 x g y 4°C. El cultivo fue lavado dos veces con tampón de electroporación enfriado en hielo (sacarosa 270 mM, MgCl₂ 1 mM, fosfato sódico 7 mM, pH 7,4) y finalmente se suspendió en un volumen de 600 µL de tampón de electroporación fresco. Esta mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación pre-enfriada con un hueco de electrodo de 0,4 cm que contenía 1 µg de la mezcla de plásmido metilado y fue pulsado inmediatamente usando el sistema de electroporación Gene pulser Xcell (Bio-Rad) con los siguientes parámetros: 2,5 kV, 600 Ω y 25 µF. Se alcanzaron constantes de tiempo de 3,7-4,0 ms. La regeneración se llevó a cabo en 5 mL de medio PETC que tenía 10 g/L de MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) como tampón.

A continuación las células fueron llevadas a placa sobre medio sólido PETC-MES (1,2% Bacto Agar) con tiamina y extracto de levadura y también 5 µg/mL de claritromicina como agente seleccionable, o se lavaron dos veces y se llevaron a placa sobre medio sólido PETC-MES sin extracto de levadura y sin tiamina. En ambos casos, se obtuvieron más de 50 colonias positivas que portaban el plásmido por cada placa, después de 3 días usando claritromicina como agente seleccionable y *ermC* como marcador seleccionable y después de 6 días sobre placas sin extracto de levadura y tiamina usando *thiC* como marcador seleccionable.

25 Crecimiento de *C. autoethanogenum* modificada con *thiC* en ausencia de tiamina

Se seleccionaron colonias individuales y se llevaron a cabo experimentos de crecimiento para comparar el crecimiento en medio PETC sin tiamina ni extracto de levadura y gas de acería como única fuente de energía y carbono usando *C. autoethanogenum* DSM23693 natural y la cepa que porta el plásmido pMTL85246-*thiC*-purF. Aunque el crecimiento de la versión natural cesó después de dos etapas de subcultivo (o en la primera etapa de subcultivo si las células eran lavadas antes de la inoculación), la cepa que portaba el plásmido pMTL85246-*thiC*-purF fue capaz de crecer de forma sostenida durante múltiples etapas de subcultivo (independientemente de si las células habían sido lavadas o no) (Figura 5). Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado usando botellas de suero y un volumen de 50 mL. La presencia de plásmido se comprobó mediante PCR.

35 Esto demuestra que el organismo es capaz de sintetizar tiamina por sí mismo y que se puede usar el *thiC* como marcador seleccionable en el acetógeno carboxidotrófico *C. autoethanogenum*.

Uso de panBCD como marcador seleccionable

Los inventores han identificado que *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* y *C. ragsdalei* presentan una ruta de pantotenato incompleta que carece de los genes biosintéticos panBCD, que codifican una 3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferasa (EC:2.1.2.11; que cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato y ácido 3-metil-2-oxobutanoico en tetrahidrofolato y 2-deshidropantoato), pantoato-beta-alanina ligasa (EC:6.3.2.1; que cataliza la reacción de (R)-pantoato + beta-alanina en difosfato + pantotenato), y aspartato 1-descarboxilasa (EC:4.1.1.11; que cataliza la conversión de L-aspartato en beta-alanina). En otros acetógenos tales como *Acetobacterium woodii*, cuyo genoma (Poehlein et al, 2012, PLoS One 7: e33439), también se observó que los genes *panB* y *panC* también estaban ausentes, mientras que el resto de la ruta de biosíntesis de pantotenato estaba presente.

En estos organismos se puede aplicar el mismo principio de *thiC* y tiamina como marcador y agente seleccionable para *panBCD* y pantotenato. Mientras que en el caso de *thiC* solo se requiere un gen, aquí faltan tres genes. Sin embargo, se ha observado que los tres genes se organizan en un grupo, por ejemplo, en *C. beijerinckii* (Figura 4). Este grupo (NC_009617.1, 3038300-3034200) que incluye las regiones promotoras y los genes *panB* (Cbei_2610; ID de gen: 5293811; YP_001309722.1), *panC* (Cbei_2609; ID de gen: 5293810; YP_001309721.1), y *panD* (Cbei_2608; ID de gen: 5293809; YP_001309720.1) se pueden amplificar a partir del ADN genómico de *C. beijerinckii* mediante PCR y clonarse en un vector de expresión como se ha descrito para el gen *thiC* procedente de *C. ragsdalei*. Esta construcción podría usarse entonces de un modo similar a como se ha descrito para la construcción de *thiC* omitiendo pantotenato en lugar de tiamina para la expresión en un organismo que carece de cualquiera de estos genes, tal como los acetógenos carboxidotróficos *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, *A. woodii* y *C. ragsdalei* o una cepa negativa para *panBCD* de *E. coli* tal como *E. coli* JW0129-1 (*panC750(del)::kan*), JW0130-1 (*panB751(del)::kan*), y JW0127-2 (*panD748(del)::kan*) (Baba et al, 2006, Mol. Syst. Biol., 2: 1-11), que pueden obtenerse del "Coli Genetic Stock Centre" (CGSC).

Clonación de panBCD

Se clonaron los genes *panBCD* en un vector de expresión usando clonación "GeneArt Seamless" y el kit "Assembly" (Life Technologies). Se diseñaron grandes cebadores de PCR que contenían una homología de solapamiento de 20 pb con respecto al vector deseado.

Cebador	Secuencia
panBC D-83155-F1	AGGAAATGAACATGAAACATGTGAAAAATACAGTATTAAC TTTTAAAC AAG (SEQ ID NO: 16)
panBC D-GeneD-R1	GACGTCGACTCTAGAGGATCTTATTCATTTGATTCATAATTAGTTATTTCTTTTATTG (SEQ ID NO: 17)

La secuencia del panBCD fue amplificada mediante PCR usando ADN polimerasa de alta fidelidad iProof procedente de *C. beijerinckii*. El protocolo para amplificar el fragmento de 2813 pb fue: inicialización 30 s; desnaturalización 10 s, maduración 30 s, extensión 2 minutos y una etapa final de extensión de 7 minutos.

El ADN se purificó usando "DNA Clean and Concentrator-5" (Zymo Research). El vector pMTL 83155 que portaba el marcador de resistencia a antibiótico catP junto con el promotor Ppta fue digerido usando NdeI y BamHI (Fermentas) y se purificó usando "DNA Clean and Concentrator-5" (Zymo Research). Se mezclaron 100 ng del vector digerido con una relación molar 2:1 de inserto, junto con 5X tampón de reacción y 10X mix de enzimas V, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se transformó inmediatamente en células competentes de *E. coli* One Shot TOP10. Se esparcieron 50 µL de *E. coli* transformadas en placas de agar LB que contenían 5 µg/mL de cloranfenicol. Se cribaron cuatro colonias usando iNtron Maxime PCR PreMix i-MAX II (Tech Dragon Limited) a partir de una incubación de una noche.

Cebador	Secuencia
M13F	TGTAACGACGGCCAGT (SEQ ID NO: 18)
M13 R	CAGGAAACAGCTATGACC (SEQ ID NO: 19)

El protocolo para amplificar el fragmento de 3404 pb fue: inicialización 30 s, desnaturalización 10 s, maduración 30 s, extensión 2 minutos, y una etapa final de extensión de 7 minutos.

Los cuatro plásmidos fueron comprobados adicionalmente mediante digestión de restricción usando NotI y EcoRV (Fermentas). Los tamaños esperados a partir de la digestión: 2343 pb y 5383 pb, plásmido sin digerir: 7726 pb.

A lo largo de la presente especificación y cualesquier reivindicaciones que la siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras “comprende”, “que comprende” y similares, deben considerarse en un sentido inclusivo en lugar de un sentido exclusivo, es decir, en el sentido de “que incluye, pero sin limitación”.

Listado de secuencias

<110> LanzaTech NZ Ltd.

10 <120> MÉTODO DE SELECCIÓN Y MICROORGANISMOS RECOMBINANTES Y USOS PARA LOS MISMOS

<130> 008156.00002 (LT82)

<150> 61/650.757

15 <151> 23-05-2012

<160> 19

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

20

<210> 1

<211> 3063

<212> ADN

<213> Clostridium ragsdalei

25

<400> 1

gcatcctgca	ggtaaatfff	gttcttcatt	aaaaatffag	caaaattcct	ctaaacttaa	60
atattctaaa	gtagtagcac	ctatttctff	tctatttcc	tctatactff	tacaagctgc	120
tataagttcc	ftttttattc	ctatatcaat	acctagatga	cagcagatt	ttatagaagg	180
tgatgcaatt	ctaaaaatgaa	cttcttttgc	tcattttttt	aataaagatt	taacaactff	240
tctacaacta	gttctcttaa	ctatagaatc	atctataact	attacccttc	tcccttttat	300
ttcattaaac	aaaggactta	actttatgtc	taccatactt	tctcttagat	ttttatgctg	360
aaatataaaa	cttcttactg	catatttatt	ttttataaaa	cctagcccat	aagggaattcc	420
agaagcctff	gaataaccta	tagctgcagg	tataccagaa	tccggtacac	caataactat	480
atccccttca	acagcatgat	ttttatataa	cttttttccc	gcactaattc	tagattcata	540
cacacttatt	ccatctataa	tactgtctcc	tctagcaaaa	tatatatt	caaatgaaca	600
aaatccataa	ttttttctta	aaaacattaa	cactttccat	tgatttatta	cttataataa	660
tcatttctcc	aggattaaca	tctcttataa	attctatttt	cagagaagat	aatgcacaac	720
tttctgaact	tataacataa	ttgccattta	attttcctat	gcataatggt	cttatgccta	780
aagaatctct	tactgctatt	aatgtatctt	tagtagaaag	aattagagaa	taggaacctt	840
ttaaatattt	aagtccatta	ataaaactgt	cttttatttc	tacatgaggt	tccatttcca	900
aaagctttaa	aattacttct	gaatctgaag	tagtttttaa	aacagcacct	ttggctttta	960
atftttctff	aagccctctt	gcatttagta	tattttccat	atgtgcaata	gcaatftttcc	1020
ctftaaagctc	ttgtaatttc	tccacatcaa	atacctgaga	aactaatccc	atacctttat	1080
agcagttaat	ctgttctcca	tctgaaatg	ctatttctgc	actttctgt	cctctatggt	1140
gaagagccga	aaggccataa	tacatgatat	taccctaagta	aatatcttca	ttggaaaata	1200
cgccaaaaat	tcccacaagc	tctttcggct	tatcttctg	aattccttta	agctcataca	1260
tcaatcatca	tctcttataa	cafttaaat	ttttcttcc	ataaccttat	tcatatttct	1320
aacagcacac	atftttccac	acatagtaca	tgatgttca	tcttctggt	ttgatcttcc	1380
tctatatctt	cttgcctff	ctggatctat	agataaatca	aatatftttt	tccaattaag	1440
ctctcttcta	gctttactca	tagcattatc	ccagtctctt	gcacctttta	ttccctttgc	1500
aatatctctt	gcatgagctg	caattttagt	agctatgatt	ccttctttca	tatcttctaa	1560
gtttggaggt	cttaaatggt	ctgctggagt	tacataacat	agaaaatctg	ctcctgaaga	1620
tgcaagctatt	gctctctcta	tagctgatgt	aatgtgatca	taacctggtg	ctatgtctgt	1680
aactaaaggt	cctaacacat	aaaatggtgc	attatgacac	aatttctftt	ctatctgcat	1740
atfttgcftt	atfttcatct	aactcatatg	ccctggctct	tctatcataa	cttgtacatt	1800
tctcttccaa	gctctftttg	caagctctcc	taaagtcata	agctccttaa	tttgtgaagc	1860
atctgtagaa	tcctttatag	cacctggtct	gcaagcatct	cctaaactta	tagttacatc	1920
atattftttca	catatatcta	aaaccttatc	aaaatgctcg	taaaaaggat	tttctftttcc	1980
atfttaattcc	atattaaagc	atattaaagc	tccacctctg	gatacaatat	tcataagctt	2040
ttcatttctc	ttaaaaatg	ctgcagcttc	tctatttata	cctgcatgaa	tagtcataaa	2100
atccacacca	ttttgcgcat	gtttttcgat	tacacctaaa	agttcttctt	cagttatgct	2160
ttftaattct	ttgtcataaa	atcccactgc	atcatacata	ggcactgttc	ctatcatagc	2220
aggtgacatt	tctactagtt	tagttctaaa	ttcttcagtt	tttccaaagc	aacttaaatc	2280
cattatagct	tctgtcttca	tttctaaagc	tgctttaaacc	tttcttagtt	cgctccttat	2340
gcaattgagc	tccrttgaat	ttcccaggtt	tacatttatc	ttagttttta	ggtattgtcc	2400
cacaccttct	ggatctaatg	atfttatgatt	tttatttagct	ggtatttaca	ctgcacctg	2460
tgcaactaat	tccattagtt	gtagtgtttt	catattttct	ttagcagcta	cccttcccat	2520
ttcctttgta	atattgcctt	ttttagcaac	atccatttgt	gtcgtgtaat	tcattttaaa	2580
catctccctt	aacatatttt	tcaaaaacta	tgfttaataa	aaaaggaggt	gattctaaat	2640

ES 2 661 953 T3

```
ctccctcata ttcattctta tataaataaa aaaatgcaac cttataaagt tgcattttaa 2700
aactatataa agctcttccc tacgctggaa ttatccagat caggatagag ggtcagaact 2760
aacagttcta tctcagccta taacatagac ccccctagat tatttaattt tacatgtaaa 2820
ttatatcata tatgtttaat tttttaaact gtacattttt ataccttcaa taagtaattg 2880
gagatttaca cccaaatacc cctttaactt cttataataa agttataata taattataag 2940
gtttataaaa agatccagat ttatatacat taacatttta attaaaaatt gataatggtg 3000
aattaattat attttataaa tctaggaaac ctaaagaaag gagataatcg tattgggccc 3060
tgc 3063
```

<210> 2

<211> 1296

5 <212> ADN

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 2

```
atggatggtg ctaaaaaagg cataattaca aaggaaatgg gaagggtagc tgctaagaa 60
aatatgaaac cactacaact aatggaatta gttgcacagg gtgcagttgt aataccagct 120
aataaaaaatc ataaatcatt agatccagaa ggtgtgggac aataccttaa aactaagata 180
aatgtaaac tgggaatttc aaaggactgc aattgcatag aggacgaact agaaaagggt 240
aagacagctt tagaaatgaa agcagaagct ataatggatt taagttgctt tggaaaaact 300
gaagaattta gaactaaact agtagaaatg tcacctgcta tgataggaac agtgcctatg 360
tatgatgcag tgggatttta tgacaaagaa ttaaagaca taactgaaga agaactttta 420
gggtgtaatcg aaaaacatgc gcaaaatggt gtggatttta tgactattca tgcaggata 480
aatagagaga ctgcagcaat ttttaagaga aatgaaagac ttatgaatat tgtatccaga 540
ggtggagctt taatatatgc atggatggaa ttaaatggaa aagaaaatcc tttttacgag 600
cattttgata aggttttaga tatatgtgaa aaatatgatg taactataag tttaggagat 660
gcttgcagac caggtgctat aaaggattct acagatgctt cacaatttaa ggagcttatg 720
acttttaggag agcttgcaaa aagagcttgg aagagaaatg tacaagttat gatagaagga 780
ccagggcata tgagtttaga tgaataaaaa gcaaatatgc agatagaaaa gaaattgtgt 840
cataatgcac cattttatgt gttaggacct ttagttacag acatagcacc aggttatgat 900
cacattacat cagctatagg aggagcaata gctgcatcct caggagcaga ttttctatgt 960
tatgtaactc cagcagaaca ttttaagactt ccaacttag aagatatgaa agaaggaatc 1020
atagctacta aaattgcagc tcatgcagga gatattgcaa agggaataaa aggtgcaaga 1080
gactgggata atgctatgag taaagctaga agagagccta attggaaaaa aatatttgat 1140
ttatctatag atccagaaaa ggcaagaaga tatagagaag aatcaaaacc agaagatgaa 1200
catacatgta ctatgtgtgg aaaaatgtgt gctgttagaa atatgaataa ggttatggaa 1260
ggaaaaaatt taaatgtttt aagagatgat gattga 1296
```

<210> 3

<211> 431

<212> PRT

15 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 3

```
Met Asp Val Ala Lys Lys Gly Ile Ile Thr Lys Glu Met Gly Arg Val
 1 5 10 15
Ala Ala Lys Glu Asn Met Lys Pro Leu Gln Leu Met Glu Leu Val Ala
 20 25 30
Gln Gly Ala Val Val Ile Pro Ala Asn Lys Asn His Lys Ser Leu Asp
 35 40 45
Pro Glu Gly Val Gly Gln Tyr Leu Lys Thr Lys Ile Asn Val Asn Leu
 50 55 60
Gly Ile Ser Lys Asp Cys Asn Cys Ile Glu Asp Glu Leu Glu Lys Val
 65 70 75 80
Lys Thr Ala Leu Glu Met Lys Ala Glu Ala Ile Met Asp Leu Ser Cys
 85 90 95
Phe Gly Lys Thr Glu Glu Phe Arg Thr Lys Leu Val Glu Met Ser Pro
 100 105 110
Ala Met Ile Gly Thr Val Pro Met Tyr Asp Ala Val Gly Phe Tyr Asp
 115 120 125
Lys Glu Leu Lys Asp Ile Thr Glu Glu Glu Leu Leu Gly Val Ile Glu
 130 135 140
Lys His Ala Gln Asn Gly Val Asp Phe Met Thr Ile His Ala Gly Ile
 145 150 155 160
Asn Arg Glu Thr Ala Ala Ile Phe Lys Arg Asn Glu Arg Leu Met Asn
 165 170 175
Ile Val Ser Arg Gly Gly Ala Leu Ile Tyr Ala Trp Met Glu Leu Asn
 180 185 190
```

20

ES 2 661 953 T3

Gly Lys Glu Asn Pro Phe Tyr Glu His Phe Asp Lys Val Leu Asp Ile
 195 200 205
 Cys Glu Lys Tyr Asp Val Thr Ile Ser Leu Gly Asp Ala Cys Arg Pro
 210 215 220
 Gly Ala Ile Lys Asp Ser Thr Asp Ala Ser Gln Ile Lys Glu Leu Met
 225 230 235 240
 Thr Leu Gly Glu Leu Ala Lys Arg Ala Trp Lys Arg Asn Val Gln Val
 245 250 255
 Met Ile Glu Gly Pro Gly His Met Ser Leu Asp Glu Ile Lys Ala Asn
 260 265 270
 Met Gln Ile Glu Lys Lys Leu Cys His Asn Ala Pro Phe Tyr Val Leu
 275 280 285
 Gly Pro Leu Val Thr Asp Ile Ala Pro Gly Tyr Asp His Ile Thr Ser
 290 295 300
 Ala Ile Gly Gly Ala Ile Ala Ala Ser Ser Gly Ala Asp Phe Leu Cys
 305 310 315 320
 Tyr Val Thr Pro Ala Glu His Leu Arg Leu Pro Asn Leu Glu Asp Met
 325 330 335
 Lys Glu Gly Ile Ala Thr Lys Ile Ala Ala His Ala Gly Asp Ile
 340 345 350
 Ala Lys Gly Ile Lys Gly Ala Arg Asp Trp Asp Asn Ala Met Ser Lys
 355 360 365
 Ala Arg Arg Glu Leu Asn Trp Lys Lys Ile Phe Asp Leu Ser Ile Asp
 370 375 380
 Pro Glu Lys Ala Arg Arg Tyr Arg Glu Glu Ser Lys Pro Glu Asp Glu
 385 390 395 400
 His Thr Cys Thr Met Cys Gly Lys Met Cys Ala Val Arg Asn Met Asn
 405 410 415
 Lys Val Met Glu Gly Lys Asn Leu Asn Val Leu Arg Asp Asp Asp
 420 425 430

<210> 4

<211> 672

5 <212> ADN

<213> Clostridium ragsdalei

<400> 4

atgtatgagc ttaaaggaat tcaagaagat aagccgaaag aggcttgtgg aatTTTTggc 60
 gtatttcca atgaagatat ttacttaggt aatatcatgt attatggcct ttcggctctt 120
 caacatagag gacaggaaag tgcaggaata gcaatttcag atggagaaca gattaactgc 180
 tataaaggta tgggattagt ttctcaggta tttgatgtgg agaaattaca agagcttaaa 240
 gggaaaattg ctattgcaca taatggaat ataactaatg cagaggggct taaagaaaaa 300
 ttaaagcca aaggtgctgt ttttaaaact acttcagatt cagaagtaat tttaaagctt 360
 ttggaatgg aacctcatgt agaaataaaa gacaagtta ttaatggact taaatattta 420
 aaaggttctt atttcttaat tcttttact aaagatacat taatagcagt aagagattct 480
 ttaggcataa gaccattatg cataggaaaa ttaaattgca attatggtat aagttcagaa 540
 agttgtgcat tatcttctct gaaaatagaa ttataagag atgttaatcc tggagaaatg 600
 attattataa gtaataaatc aatggaaagt gttaatgttt ttaagaaaaa attatggatt 660
 10 ttgttcattt ga 672

<210> 5

<211> 223

<212> PRT

15 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 5

Met Tyr Glu Leu Lys Gly Ile Gln Glu Asp Lys Pro Lys Glu Ala Cys
 1 5 10 15
 Gly Ile Phe Gly Val Phe Ser Asn Glu Asp Ile Tyr Leu Gly Asn Ile
 20 25 30
 Met Tyr Tyr Gly Leu Ser Ala Leu Gln His Arg Gly Gln Glu Ser Ala
 35 40 45
 Gly Ile Ala Ile Ser Asp Gly Glu Gln Ile Asn Cys Tyr Lys Gly Met
 50 55 60
 Gly Leu Val Ser Gln Val Phe Asp Val Glu Lys Leu Gln Glu Leu Lys
 65 70 75 80
 Gly Lys Ile Ala Ile Ala His Asn Gly Asn Ile Thr Asn Ala Glu Gly
 85 90 95

20

ES 2 661 953 T3

Leu Lys Glu Lys Leu Lys Ala Lys Gly Ala Val Phe Lys Thr Thr Ser
 Asp Ser Glu Val Ile Leu Lys Leu Leu Glu Met Glu Pro His Val Glu
 Ile Lys Asp Lys Phe Ile Asn Gly Leu Lys Tyr Leu Lys Gly Ser Tyr
 Ser Leu Ile Leu Ser Thr Lys Asp Thr Leu Ile Ala Val Arg Asp Ser
 Leu Gly Ile Arg Pro Leu Cys Ile Gly Lys Leu Asn Gly Asn Tyr Val
 Ile Ser Ser Glu Ser Cys Ala Leu Ser Ser Leu Lys Ile Glu Phe Ile
 Arg Asp Val Asn Pro Gly Glu Met Ile Ile Ile Ser Asn Lys Ser Met
 Glu Ser Val Asn Val Phe Lys Lys Lys Leu Trp Ile Leu Phe Ile

<210> 6
 <211> 507
 <212> ADN
 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 6

gtgtatgaat ctagaattag tgcgggaaaa aagttatata aaaatcatgc tgttgaaggg 60
 gatatagtta ttgggtgacc ggattctggg atacctgcag ctatagggta ttcaaaggct 120
 tctggaattc cttatgggct aggttttata aaaaataaat atgcagtaag aagttttata 180
 tttccgcata aaaatctaag agaaaagtat gtagacataa agttaagtcc tttgtttaat 240
 gaaataaaag ggagaagggt aatagttata gatgattcta tagttagagg aactagttgt 300
 agaaaagttg ttaaatcttt attaaaaaat ggagcaaaag aagttcatt tagaattgca 360
 tcaccttcta taaaatactg ctgtcatcta ggtattgata taggaataaa aaaggaactt 420
 atagcagctt gtaaaagtat agaggaaata agaaaagaaa taggtgctac tactitagaa 480
 tatttaagtt tagaggaatt ttgctaa 507

<210> 7
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Clostridium ragsdalei

<400> 7

Met Tyr Glu Ser Arg Ile Ser Ala Gly Lys Lys Leu Tyr Lys Asn His
 Ala Val Glu Gly Asp Ile Val Ile Gly Val Pro Asp Ser Gly Ile Pro
 Ala Ala Ile Gly Tyr Ser Lys Ala Ser Gly Ile Pro Tyr Gly Leu Gly
 Phe Ile Lys Asn Lys Tyr Ala Val Arg Ser Phe Ile Phe Pro His Lys
 Asn Leu Arg Glu Ser Met Val Asp Ile Lys Leu Ser Pro Leu Phe Asn
 Glu Ile Lys Gly Arg Arg Val Ile Val Ile Asp Asp Ser Ile Val Arg
 Gly Thr Ser Cys Arg Lys Val Val Lys Ser Leu Leu Lys Asn Gly Ala
 Lys Glu Val His Phe Arg Ile Ala Ser Pro Ser Ile Lys Tyr Cys Cys
 His Leu Gly Ile Asp Ile Gly Ile Lys Lys Glu Leu Ile Ala Ala Cys
 Lys Ser Ile Glu Glu Ile Arg Lys Glu Ile Gly Ala Thr Thr Leu Glu
 Tyr Leu Ser Leu Glu Glu Phe Cys

<210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótidos sintéticos ThiC-Apa-F

<400> 8

gcagggccca atacgattat ctctcttc 28

ES 2 661 953 T3

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótidos sintéticos ThiC+PurF-Rev-Sbfl

10 <400> 9

gcatcctgca ggtaaatttt gttcttcatt 30

<210> 10
 15 <211> 3540
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Vector lanzadera pMTL85246

<400> 10

aaactccttt	ttgataatct	catgaccaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	60
gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	120
atctgctgct	tgcaaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttggtt	gccggatcaa	180
gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	240
gttcttctag	tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	300
tacctcgctc	tgctaatacct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	360
accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	420
ggttcgtgca	cacagcccag	cttggagcga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	480
cgtgagctat	gagaaaagcgc	cacgcttccc	gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggta	540
agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgctgtgtat	600
ctttatagtc	ctgtcggggt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgatTTTT	gtgatgctcg	660
tcaggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	cctttttacg	gttccctggcc	720
ttttgctggc	cttttgctca	catgttcttt	cctgctgtat	ccccctgattc	tgtggataac	780
cgtattaccg	cctttgagtg	agctgatacc	gctcgccgca	gccgaacgac	cgagcgcagc	840
gagtcagtga	gagaggaagc	ggaagagcgc	ccaatacgca	gggccccctg	caggataaaa	900
aaattgtaga	taaattttat	aaaatagttt	tatctacaat	ttttttatca	ggaaacagct	960
atgaccgcgg	ccgcaaaata	gttgataata	atgcagagtt	ataaacaag	gtgaaagca	1020
ttacttgtat	tcttttttat	atattattat	aaattaaaa	gaagctgtat	tagaaaaaat	1080
acacacctgt	aatataaaa	tttaaattaa	tttttaattt	tttcaaaatg	tattttacat	1140
gtttagaatt	ttgatgtata	ttaaaatagt	agaatacata	agatacttaa	tttaattaaa	1200
gatagttaag	tacttttcaa	tgtgcttttt	tagatgttta	atacaaatct	tttaattgtaa	1260
aagaaatgct	gtactattta	ctgtactagt	gacgggatta	aactgtatta	attataaata	1320
aaaaataagt	acagttgttt	aaaattatat	tttgattata	atctaatagt	acgatgtaag	1380
ttattttata	ctattgctag	tttaataaaa	agatttaatt	atataactga	aaaggagagg	1440
aatccatatg	accatgatta	cgaattcgag	ctcggatacc	ggggatcctc	tagagtcgac	1500
gtcacgcgct	catggagatc	tcgaggcctg	cagacatgca	agcttggcac	tggccgctgt	1560
tttacaacgt	cgtgactggg	aaaaccctgg	cgttacccaa	cttaatcgcc	ttgcagcaca	1620
tccccctttc	gccagctggc	gtaatagcga	agaggcccgc	accgatcgcc	cttccaaca	1680
gttgcgcagc	ctgaaatggcg	aatggcgcta	gcataaaaat	aagaagcctg	catttgcagg	1740
cttcttattt	ttatggcgcg	ccgcattcac	ttcttttcta	tataaatatg	agcgaagcga	1800
ataagcgtcg	gaaaagcagc	aaaaagtttc	ctttttgctg	ttggagcatg	ggggttcagg	1860
gggtgcagta	tctgacgtca	atgccgagcg	aaagcgagcc	gaagggtagc	atttacgtta	1920
gataaccccc	tgatatgctc	cgacgcctta	tatagaaaag	aagattcaac	taggtaaaat	1980
cttaatatag	gttgagatga	taaggtttat	aaggaatttg	tttgttctaa	ttttcactc	2040
attttgttct	aatttctttt	aacaaatggt	cttttttttt	tagaacagtt	atgatatagt	2100
tagaatagtt	taaaataagg	agtgagaaaa	agatgaaaaga	aagatatgga	acagtcctata	2160
aaggctctca	gaggctcata	gacgaagaaa	gtggagaagt	catagaggta	gacaagtatt	2220
accgtaaaaca	aacgtctggt	aacttcgtaa	aggcataat	agtgcaatta	ataagtatgt	2280
tagatatgat	tggcggaaaa	aaacttaaaa	tcgttaacta	tatcctagat	aatgtccact	2340
taagtaacaa	tacaatgata	gctacaacaa	gagaaatagc	aaaagctaca	ggaacaagtc	2400
tacaaacagt	aataacaaca	cttaaaatct	tagaagaagg	aaatattata	aaaagaaaaa	2460
ctggagtatt	aatgttaaac	cctgaactac	taatgagagg	cgacgaccaa	aaacaaaaat	2520
acctcttact	cgaatttggg	aactttgagc	aagaggcaaa	tgaaatagat	tgacctccca	2580

25

ES 2 661 953 T3

```

ataacaccac gtagttattg ggaggtcaat ctatgaaatg cgattaaggg ccggccgaag 2640
caaaacttaag agtgtgttga tagtgcagta tcttaaaatt ttgtataata ggaattgaag 2700
ttaaattaga tgctaaaaat ttgtaattaa gaaggagtga ttacatgaac aaaaatataa 2760
aaatttctca aaacttttta acgagtgaaa aagtactcaa ccaataataa aaacaattga 2820
atntaaaaga aaccgatacc gtttacgaaa ttggaacagg taaagggcat ttaacgacga 2880
aactggctaa aataagtaaa caggtaacgt ctattgaatt agacagtcac ctattcaact 2940
tatcgtcaga aaaattaaaa ctgaatactc gtgtcacttt aattcaccaa gatattctac 3000
agtttcaatt ccctaacaaa cagaggataa aaattgttgg gagtattcct taccatttaa 3060
gcacacaaat tattaaaaaa gtgggttttg aaagccatgc gtctgacatc tatctgattg 3120
ttgaagaagg attctacaag cgtaccctgg atattcacgg aacactaggg ttgctcttgc 3180
acactcaagt ctcgattcag caattgctta agctgccagc ggaatgcctt catcctaaac 3240
caaaagtaaa cagtgtctta ataaaactta cccgccatac cacagatggt ccagataaat 3300
attggaagct atatacgtac tttgtttcaa aatgggtcaa tcgagaatat cgtaactgtt 3360
ttactaaaaa tcagtttcat caagcaatga aacacgccaa agtaacaat ttaagtaccg 3420
ttacttatga gcaagtattg tctattttta atagttatct attatttaac gggaggaaat 3480
aattctatga gtcgcttttg taaatttggg aagttacacg ttactaaagg gaatgtgttt 3540

```

<210> 11
 <211> 6582
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> plásmido pMTL85246-thiC-purF

10 <400> 11

```

ggtaaatttt gttcttcatt aaaaatttag caaaattcct ctaaacttaa atattctaaa 60
gtagtagcac ctatctcttt tcttatttcc tctatacttt tacaagctgc tataagttcc 120
ttttttattc ctatatcaat acctagatga cagcagatatt ttatagaagg tgatgcaatt 180
ctaaaatgaa cttcttttgc tccatttttt aataaagatt taacaacttt tctacaacta 240
gttcctctaa ctatagaatc atctataact attacccttc tcccttttat ttcattaaac 300
aaaggactta actttatgtc taccatactt tctcttagat ttttatgchg aaataataaa 360
cttcttactg catattttatt ttttataaaa cctagcccat aaggaattcc agaagccttt 420
gaataaccta tagctgcagc tataccagaa tccggtagac caataactat atccccttca 480
acagcatgat tttttatata cttttttccc gctaactc tagattcata cacacttatt 540
ccatctataa tactgtctcc tctagcaaaa tatatatatt caaatgaaca aaatccataa 600
tttttcttta aaaaccattaa cactttccat tgatttatta cttataataa tcatttctcc 660
aggattaaca tctcttataa attctatttt cagagaagat aatgcacaac tttctgaact 720
tataacataa ttgccattta attttctat gcataatggt cttatgccta aagaatctct 780
tactgctatt aatgtatctt tagtagaag aattagagaa taggaacctt ttaaattatt 840
aagtccatta ataaacttgt cttttatttc tacatgaggt tccattttca aaagctttaa 900
aattacttct tagttctgaag tagttttaaa aacagcacct ttggctttta attttcttt 960
aagccctctt gcattagtta tttttccatt atgtgcaata gcaattttcc ctttaagctc 1020
ttgtaatttc tccacatcaa ataccctgaga aactaatccc atacccttat agcagttaat 1080
ctgttctcca ctgtaaatgg ctaattcctgc actttcctgt cctctatggt gaagagccga 1140
aaggccataa tacatgatat tacctaagta aatatcttca ttggaaaata cgccaaaaat 1200
tccacaagcc tctttcggct tatcttcttg aattccttta agctcataca tcaatcatca 1260
tctcttaaaa catttaaat ttttcttcc ataaccctat tcatatttct aacagcacac 1320
atttttccac acatagtaca tgtatgttca tcttctggtt ttgattcttc tctatatctt 1380
cttgcccttt ctggatctat agataaatca aatatttttt tccaattaag ctctcttcta 1440
gctttactca tagctattat ccagctctct gcacctttta ttccctttgc aatatctctt 1500
gcatgagctg caattttagt agctatgatt ccttctttca tatcttctaa gtttggaggt 1560
cttaaatgtt ctgctggagt tacataacat agaaaaatctg ctctctgaaga tgcagctatt 1620
gctcctccta tagctgatgt aatgtgatca taacctgggt ctatgtctgt aactaaaggt 1680
cctaacacat aaaatgggtgc attatgacac aatttctttt ctatctgcac atttgctttt 1740
atttcatcta aactcatatg ccctggtcct tctatcataa ctgtgacatt tctcttccaa 1800
gctctttttg caagctctcc taaagtcata agctccttaa ttgtgaagc atctgtagaa 1860
tcctttatag cactgggtct gcaagcatct cctaaactta tagttacatc atatttttca 1920
catatatcta aaaccttatc aaaatgctcg taaaaaggat tttcttttcc atttaattcc 1980
atccatgcat atattaaagc tccacctctg gatacaatat tcataagctt ttcattttct 2040
ttaaaaattg ctgcatctc tctatttata cctgcatgaa tagtcataaa atccacacca 2100
ttttgcgcat gttttctgat tacacctaaa agticttctt cagttagtgc ttttaattct 2160
ttgtcataaa atcccactgc atcatacata ggcactgttc ctatcatagc aggtgacatt 2220
tctactagtt tagttctaaa ttcttcagtt ttcccaaagc aacttaaatc cattatagct 2280
tctgctttca tttctaaagc tgtcttaacc ttttctagt cgtcctctat gcaattgcag 2340
tcctttgaaa ttcccaagtt tacatttatc ttagttttaa ggtattgtcc cacaccttct 2400
ggatctaatt atttatgatt tttattagct ggtattacaa ctgcaccctg tgcaactaat 2460
tccattagtt gtagtggttt catattttct ttagcagcta cccttcccat ttcctttgta 2520

```

attatgcctt	ttttagcaac	atccatttgt	gtcgtgtaat	tcattttāaa	catctccctt	2580
aacatatttt	tcaaaaacta	tgttaaataa	aaaaggagg	gattctaaat	ctccctcata	2640
ttcatcttta	tataaataaa	aaaatgcaac	cttataaagt	tgcatittaa	aactatataa	2700
agctctttcc	tacgctggaa	ttatccagat	caggatgag	ggtcagaact	aacagttcta	2760
tctcagccta	taacatagac	ccccctagat	tatttaattt	tacatgtaaa	ttatatcata	2820
tatgtttaat	tttttaaact	gtacattttt	ataccittcaa	taagtaattg	gagatttaca	2880
cccaaatacc	cctttaactt	cttataataa	agttataata	taattataag	gtttataaaa	2940
agatccagat	ttatatacat	taacatttta	atataaaatt	gataatggtg	aattaattat	3000
attttataaa	tctaggaaac	ctaaagaaag	gagataatcg	tattggggcc	tgcgatttgg	3060
gcgctcttcc	gcttcctcgc	tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	3120
ggatcagct	cactcaaagg	cggtaatcag	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	3180
aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcggtgct	3240
ggcgtttttc	cataggctcc	gcccctctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	3300
gaggtggcga	aacccgacag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	3360
cgtgcgctct	cctgtttcga	ccctgcccgt	taccggatac	ctgtcccgct	ttctcccttc	3420
gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgttaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	3480
tcgctccaag	ctgggctgtg	tgacgaaac	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttatc	3540
cggtaacat	cgtctttagt	ccaacccggt	aagacacgac	ttatgccac	tggcagcagc	3600
cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	gtacagagt	tcttgaagtg	3660
gtggcctaac	tacggctaca	ctagaagaac	agtatttggg	atctgcgctc	tgctgaagcc	3720
agttactctc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	3780
cggtggtttt	ttgttttgcg	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaggat	ctcaagaaga	3840
tcctttgatac	ttttctacgg	ggtctgacgc	gtttaggaac	gaaaactcac	gttaagggat	3900
tttggctcatg	agattatcaa	aaaggagttt	aaacacattc	cctttagtaa	cgtgtaactt	3960
tccaaattta	caaaagcgac	tcatagaatt	atctctccc	gttaataaat	agataactat	4020
taaaaataga	caataactgc	tcataagtaa	cggtacttaa	attgtttact	ttggcgtggt	4080
tcattgcttg	atgaaactga	tttttagtaa	acagttgacg	atactctcga	tgaccatt	4140
ttgaaacaaa	gtacgtatat	agcttccaat	atcttctggt	aacatctgtg	gtatggcggg	4200
taagttttat	taagacactg	ttacttttgg	gtttaggatg	aaagcattcc	gctggcagct	4260
taagcaattg	ctgaatcgag	acttgagtgt	gcaagagcaa	ccctagtgtt	cggtgaatat	4320
ccaaggtacg	cttgtagaat	ccctcttcaa	caatcagata	gatgtcagac	gcatggcttt	4380
caaaaaccac	tttttataa	atgtgtgtgc	ttaaattggt	aggaatactc	ccaacaattt	4440
tatacctctg	ttgtttaggg	aattgaaact	gtagaatata	ttggtgaatt	aaagtgcac	4500
gagttactag	ttttaaattt	tctgacgata	agtgaatag	atgactgtct	aattcaatag	4560
acgtttactg	tttacttatt	ttagccagtt	tgctcgttaa	atgcccttta	ctgttccaa	4620
tttctgtaaac	ggatctcggt	tcittttaa	tcatttggtt	tattatttgg	ttgagtactt	4680
tttactctgt	taaaaagttt	tgagaatatt	ttatattttt	gttcatgtaa	tcactccttc	4740
tttaattacaa	atittttagca	tctaatttaa	cttcaattcc	tattatacaa	aattttaaga	4800
tactgcacta	tcaactcact	cttaagtttg	cctcgccggg	cccttaactg	catttcatag	4860
attgacctcc	caataactac	gtgggtggtat	tgggagggtca	atctatttca	tttgcctctt	4920
gctcaaagtt	cccaaattcg	agtaagaggt	atittttggtt	ttggtcgtcg	cctctcatta	4980
gtagttcagg	gttttaacatt	aaactcag	ttttctttt	tataatattt	ccttctcta	5040
agattttaag	tgttgttatt	actgtttgta	gactgtttcc	tgtagctttt	gctatttctc	5100
ttgtttgtagc	tatcattgta	ttgttactta	agtggacatt	atctaggata	tagttaacga	5160
tttttaagttt	ttttccgcca	atcatatcta	acatacttat	taattgcact	atataatgct	5220
ttacgaagtt	accagacggt	tgtttacggt	ataacttgtc	tacctctatg	acttctccac	5280
tttctctgct	tatgagcctc	tgagagcctt	tatagactgt	tccatattct	tctttcatct	5340
ttttctcact	ccttatttta	aactattcta	actatatcat	aactgttcta	aaaaaaaaag	5400
aacatttgtt	aaaagaaatt	agaacaaaat	gagtgaaaaa	ttagaacaaa	caaattcctt	5460
ataaacctta	tcatctcaac	ctatattaag	attttaccta	gttgaaatct	cttttctata	5520
taaaagcgtc	gacatataca	gggggttatc	taacgtaaat	gctacccttc	ggctcgcttt	5580
cgctcggcat	tgacgtcaga	tactgcaccc	cctgaacccc	catgctccaa	cagcaaaaag	5640
gaaacttttt	gctgcttttc	cgacgcttat	tcgcttcgct	catattttata	tagaaaaaga	5700
gtgaaatgctg	cgcgccataa	aaataagaag	cctgcaaatg	caggcttctt	atttttatgc	5760
tagcgcatt	cgccattcag	gctgcgcaac	tgttgggaag	ggcgatcggg	gctggcctct	5820
tcgctattac	gccagctggc	gaaaggggga	tgtgctgcaa	ggcgattaag	ttgggtaacg	5880
ccagggtttt	cccagctcag	acgtttgtaa	acgacggcca	gtgccaagct	tgcatgtctg	5940
caggccctcga	gatctccatg	gacgcgtgac	gtcgactcta	gaggatcccc	gggtaccgag	6000
ctcgaattcg	taatcatggt	catatggatt	cctctccttt	tcaagtatat	aattaaatct	6060
ttttartaaa	ctagcaatag	tataaaaata	cttacatcgt	actattagat	ttaatacaaa	6120
atataatttt	aaacaactgt	acttattttt	tatttataat	taatacagtt	taatcccgtc	6180
actagtacag	taaatagtac	agcattttct	ttacaattaa	agatttgtat	taaacatcta	6240
aaaaagcaca	ttgaaaagta	cttaactatc	tttaattaaa	ttaaagtatc	tatgtattct	6300
actatttttaa	tatacatcaa	aattctaaac	atgtaaaaata	cattttgaaa	aaattaaaaa	6360
ttatittaaa	attttatatt	acaggtgtgt	atittttcta	atacagcttc	attttaattt	6420
ataataatat	ataaaaaaga	atacaagtaa	tgcttttcac	ccttgtttat	aactctacat	6480
tattatcaac	tattttgctg	ccgcggtcat	agctgtttcc	tgataaaaaa	attgtagata	6540
aaactatttt	ataaaaattt	tctacaattt	ttttatctctg	ca		6582

- <210> 12
- <211> 419
- 5 <212> ADN
- <213> Clostridium autoethanogenum
- <220>
- <221> promotor
- 10 <222> (0)...(0)
- <223> pta-ack
- <400> 12

ES 2 661 953 T3

```

agaaatTTTC cTTTctaaaa tattttattc catgtcaaga actctgttta tttcattaaa 60
gaactataag tacaaaagat aaggcatttg aaaaaatagg ctagtatatt gattgattat 120
ttattttaaa aaagcctaagt gaaatataa catattataa caataaaata agtattagt 180
taggattttt aaatagagta tctattttca gattaaatt ttgattattt gatttacatt 240
atataatatt gagtaaagta ttgactagca aaatTTTTg atactttaat ttgtgaaatt 300
tcttatcaaa agttataatt ttgaataatt tttattgaaa aatacaacta aaaaggatta 360
tagtataagt gtgtgtaatt ttgtgttaaa tttaaagggg gaaatgaac atgaaattg 419

```

<210> 13
5 <211> 2781
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> plásmido pGS20

<400> 13

```

tttgccacct gacgtctaag aaaaggaata ttcagcaatt tgcccgtgcc gaagaaagggc 60
ccaccctgga aggtgagcca gtgagttgat tgctacgtaa ttagttagtt agcccttagt 120
gactcgtaat acgactcact atagggctcg agtctagaga attcgatatt acccgggaac 180
tagtctgcag cccttttagt agggttaatt ggagtcacta agggttagtt agttagatta 240
gcagaaagtc aaaagccttc gaccggagggc ttttgactaa aacttccctt ggggttatca 300
ttggggctca ctcaaaggcg gtaatcagat aaaaaaaatc cttagctttc gctaaggatg 360
atTTctgcta gagatggaat agactggatg gaggcggata aagtTgcagg accacttctg 420
cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt cttgataaat ctggagccgg tgagcgtggg 480
tctcgcggta tcatTgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgat cgtagtattc 540
tacacgcagg ggagtcagg aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt 600
gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt 660
gattTaaaac ttcatTTTTa attTaaaggg atctaggtga agatcctttt tgataatctc 720
atgaccaaaa tccctTaaag tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cTtaataaga 780
tgatcttctt gagatcgttt tggctcgcgc gtaatctctt gctctgaaaa cgaaaaaac 840
gcctTgcagg gcggtttttc gaaggTtctc tgagctacca actctttgaa ccgaggtaac 900
tggctTggag gtagcgcagtc accaaaaact gtctttttag tttagcctta accggcgcat 960
gactTcaaga cttaactctc taaatcaatt accagtggct gctgccagtg gtgcttttg 1020
atgtctttcc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcggactg 1080
aaCggggggT tctgtcatac agtccagctt ggagcgaact gcctaccggg aactgagTgt 1140
caggcgtgga atgagacaaa cgccggccata acagcggaaT gacaccggta aaccgaaagg 1200
caggaacagg agagcgcacg aggggacccg caggggaaac gcctggTatc tttatagTcc 1260
tgTcgggttt cgccaccact gatTTgagcg tCagatTtCg tgatgctTgt cagggggggcg 1320
gagcctatgg aaaaacggct ttgcccggcg cctctcactt cctgtTaaG tatcttctg 1380
gcattcttcca ggaaatctcc gccccttctg taagccattt ccgctcggcg cagtCgaacg 1440
accgagcgtg gcgagTcagT gagcgaaggaa gcggaatata tctgtatca catatctgc 1500
tgagcaccgc gtgcagcctt ttttctctg ccacatgaag cacttCactg acaccctcat 1560
cagtGccaac atagTaaagc agtatacact ccgtagcgc tgaggtctgc ctctgTaaGa 1620
aggTgtTgct gactcatacc aggcctgaat cgccccatca tccagccaga aagTgagggg 1680
gccacggTtg atgagagctt TgtTgtaggt ggaccagTtg gTgattTtga actTttgctt 1740
Tgccacggaa cggtctgcgt TgtcgggaaG atgcgtgatc tgatccttca actcagcaaa 1800
agTtcgattt attcaacaaa gccacgtTgt gTctcaaaat ctctgatgtt acattgcaca 1860
agataaaaaT atatcatcat gaacaataaa actgtctgtc tacataaaca gtaatacaag 1920
gggtgtttac tagaggtTga tCgggcacgt aagaggtTcc aactttcacc ataatgaaat 1980
aagatcacta ccgggcgtat tttttgagtt atcgagattt tcaggagcta aggaagctaa 2040
aatggagaaa aaaatcacgg gatataccac cgTtgatata tcccaatggc atcgtaaaga 2100
acattTttag gcattTcagT cagTtgctca atgtaccat aaccagaccg ttcagctgga 2160
tattacggcc tttttaaaga ccgTaaagaa aaataagcac aagTtttatc cggcctttat 2220
tcacattctt gcccgcctga tgaacgctca cccggagTtt cgtatggcca tgaaagacgg 2280
tgagctggTg atctgggata gtgttCaccC ttgttacacc gTtttccatg agcaactga 2340
aacgttttCg tccctctgga gtgaatacca cgacgatttC cggcagTttc tccacatata 2400
ttcgaagat gtggcgtgtt acggTgaaaa cctggcctat ttccctaaag ggtttattga 2460
gaatagTttt tttgtctcag ccaatccctg ggtgagTttc accagTtttg attTaaacgt 2520
ggccaatagT gacaacttct tcgccccggt tttcacgatg ggcaaatatt atacgcaagg 2580
cgacaaggtg ctgatgcccg tggcgatcca ggttcatcat gccgtttgtg atggcttcca 2640
tgTcggccgc atgctTaatg aattacaaca gtactgtgat gagTggcagg gcggggcgta 2700
ataactag ctccggcaaa aaaacgggca aggtgtcacc accctgcctt ttttcttaa 2760
15 aaccgaaaag attacttCgc g 2781

```

<210> 14
<211> 601
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> metil transferasa diseñada

<400> 14

ES 2 661 953 T3

Met Phe Pro Cys Asn Ala Tyr Ile Glu Tyr Gly Asp Lys Asn Met Asn
 1 5 10 15
 Ser Phe Ile Glu Asp Val Glu Gln Ile Tyr Asn Phe Ile Lys Lys Asn
 20 25 30
 Ile Asp Val Glu Glu Lys Met His Phe Ile Glu Thr Tyr Lys Gln Lys
 35 40 45
 Ser Asn Met Lys Lys Glu Ile Ser Phe Ser Glu Glu Tyr Tyr Lys Gln
 50 55 60
 Lys Ile Met Asn Gly Lys Asn Gly Val Val Tyr Thr Pro Pro Glu Met
 65 70 75 80
 Ala Ala Phe Met Val Lys Asn Leu Ile Asn Val Asn Asp Val Ile Gly
 85 90 95
 Asn Pro Phe Ile Lys Ile Ile Asp Pro Ser Cys Gly Ser Gly Asn Leu
 100 105 110
 Ile Cys Lys Cys Phe Leu Tyr Leu Asn Arg Ile Phe Ile Lys Asn Ile
 115 120 125
 Glu Val Ile Asn Ser Lys Asn Asn Leu Asn Leu Lys Leu Glu Asp Ile
 130 135 140
 Ser Tyr His Ile Val Arg Asn Asn Leu Phe Gly Phe Asp Ile Asp Glu
 145 150 155 160
 Thr Ala Ile Lys Val Leu Lys Ile Asp Leu Phe Leu Ile Ser Asn Gln
 165 170 175
 Phe Ser Glu Lys Asn Phe Gln Val Lys Asp Phe Leu Val Glu Asn Ile
 180 185 190
 Asp Arg Lys Tyr Asp Val Phe Ile Gly Asn Pro Pro Tyr Ile Gly His
 195 200 205
 Lys Ser Val Asp Ser Ser Tyr Ser Tyr Val Leu Arg Lys Ile Tyr Gly
 210 215 220
 Ser Ile Tyr Arg Asp Lys Gly Asp Ile Ser Tyr Cys Phe Phe Gln Lys
 225 230 235 240
 Ser Leu Lys Cys Leu Lys Glu Gly Gly Lys Leu Val Phe Val Thr Ser
 245 250 255
 Arg Tyr Phe Cys Glu Ser Cys Ser Gly Lys Glu Leu Arg Lys Phe Leu
 260 265 270
 Ile Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Lys Ile Ile Asp Phe Tyr Ile Arg
 275 280 285
 Pro Phe Lys Arg Val Gly Ile Asp Pro Met Ile Ile Phe Leu Val Arg
 290 295 300
 Thr Lys Asn Trp Asn Asn Asn Ile Glu Ile Ile Arg Pro Asn Lys Ile
 305 310 315 320
 Glu Lys Asn Glu Lys Asn Lys Phe Leu Asp Ser Leu Phe Leu Asp Lys
 325 330 335
 Ser Glu Lys Cys Lys Lys Phe Ser Ile Ser Gln Lys Ser Ile Asn Asn
 340 345 350
 Asp Gly Trp Val Phe Val Asp Glu Val Glu Lys Asn Ile Ile Asp Lys
 355 360 365
 Ile Lys Glu Lys Ser Lys Phe Ile Leu Lys Asp Ile Cys His Ser Cys
 370 375 380
 Gln Gly Ile Ile Thr Gly Cys Asp Arg Ala Phe Ile Val Asp Arg Asp
 385 390 395 400
 Ile Ile Asn Ser Arg Lys Ile Glu Leu Arg Leu Ile Lys Pro Trp Ile
 405 410 415
 Lys Ser Ser His Ile Arg Lys Asn Glu Val Ile Lys Gly Glu Lys Phe
 420 425 430
 Ile Ile Tyr Ser Asn Leu Ile Glu Asn Glu Thr Glu Cys Pro Asn Ala
 435 440 445
 Ile Lys Tyr Ile Glu Gln Tyr Lys Lys Arg Leu Met Glu Arg Arg Glu
 450 455 460
 Cys Lys Lys Gly Thr Arg Lys Trp Tyr Glu Leu Gln Trp Gly Arg Lys
 465 470 475 480
 Pro Glu Ile Phe Glu Glu Lys Lys Ile Val Phe Pro Tyr Lys Ser Cys
 485 490 495
 Asp Asn Arg Phe Ala Leu Asp Lys Gly Ser Tyr Phe Ser Ala Asp Ile
 500 505 510
 Tyr Ser Leu Val Leu Lys Lys Asn Val Pro Phe Thr Tyr Glu Ile Leu
 515 520 525
 Leu Asn Ile Leu Asn Ser Pro Tyr Glu Phe Tyr Phe Lys Thr Phe
 530 535 540
 Ala Lys Lys Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Glu Tyr Tyr Pro Asn Asn Leu
 545 550 555 560
 Met Lys Leu Cys Ile Pro Ser Ile Asp Phe Gly Gly Glu Asn Asn Ile
 565 570 575
 Glu Lys Lys Leu Tyr Asp Phe Phe Gly Leu Thr Asp Lys Glu Ile Glu
 580 585 590
 Ile Val Glu Lys Ile Lys Asp Asn Cys
 595 600

5 <210> 15
 <211> 1940
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gen de metil transferasa diseñado fusionado con un promotor lac inducible

5

<400> 15

```

gcgggccgcg aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggcctttaca 60
ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 120
aaacacatat gtttccgctg aatgcctata tcgaatatgg tgataaaaa atgaacagct 180
ttatcgaaga tgtggaacag atctacaact tcattaaaaa gaacattgat gtggaagaaa 240
agatgcattt cattgaaacc tataaacaga aaagcaacat gaagaaagag attagcttta 300
gcgaagaata ctataaacag aagattatga acggcaaaaa tggcgttgtg tacaccccgc 360
cggaatggc ggcctttatg gttaaaaatc tgatcaactg taacgatgtt attggcaatc 420
cgtttattaa aatcattgac ccgagctgcg gtgagggcaa tctgatttgc aaatgttttc 480
tgtatctgaa tcgcatcttt attaagaaca ttgaggtgat taacagcaaa aataacctga 540
atctgaaact ggaagacatc agctaccaca tcgttcgcaa caatctgttt ggcttcgata 600
ttgacgaaac cgcatcaaaa gtgctgaaaa ttgatctggt tctgatcagc aaccaattta 660
gcgagaaaaa tttccagggt aaagactttc tggtgaaaaa tattgatcgc aaatatgacg 720
tgttcattgg taatccgccc tatatcggtc acaaaagcgt ggacagcagc tacagctacg 780
tgctgcgcaa aatctacggc agcatctacc gcgacaaaag cgataatcagc tattgtttct 840
ttcagaagag cctgaaatgt ctgaaggaag gtggcaaacg ggtgtttgtg accagccgct 900
acttctgcga gagctgcagc ggtaaaagac tgcgtaaat cctgatcgaa aacacgagca 960
tttacaagat cattgatttt tacggcatcc gccggttcaa acgctgtgggt atcgatccga 1020
tgattatttt tctggttcgt acgaagaact ggaacaataa cattgaaatt attcgcgccg 1080
acaagattga aaagaacgaa aagaacaaat tcctggatag cctgttctcg gacaaaagcg 1140
aaaagtgtaa aaagttagc attagccaga aaagcattaa taacgatggc tgggttttcg 1200
tggacgaagt ggagaaaaac attatcgaca aaatcaaaga gaaaagcaag ttcattctga 1260
aagatatttg ccatagctgt caaggcatta tcaccggttg tgatcgcgcc tttattgtgg 1320
accgtgatat catcaatagc cgtaagatcg aactgcgtct gattaaaccg tggattaaaa 1380
gcagccatat ccgtaagaat gaagttatta agggcgaaaa attcatcacc tatagcaacc 1440
tgatttgaaa tgaaccgag tgtccgaatg cgattaaata tatcgaacag tacaagaaac 1500
gtctgatgga gcgccgcaaa tgcaaaaagg gcacgcgtaa gtggtatgaa ctgcaatggg 1560
gccgtaaacc ggaaatcttc gaagaaaaga aaattgtttt cccgtataaa agctgtgaca 1620
atcgttttgc actggataag ggtagctatt ttgagcgaga catttatagc ctggttctga 1680
agaaaaatgt gccgttcacc tatgagatcc tgctgaatat cctgaatagc ccgctgtacg 1740

agttttactt taagaccttc gcgaaaaagc tgggcgagaa tctgtacgag tactatccga 1800
acaacctgat gaagctgtgc atcccagca tcgatttcgg cggtgagaac aatattgaga 1860
aaaagctgta tgatttcttt ggtctgacgg ataaagaaat tgagattgtg gagaagatca 1920
aagataactg ctaagaattc
    
```

10

<210> 16

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador de oligonucleótido

<400> 16

20

aggaaatgaa catgaaacat gtgaaaaata cagtattaac ttttaacaa g 51

<210> 17

<211> 58

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido

30

<400> 17

gacgtcgact ctgaggatc ttattcattt gattcataat tagttatttc ttttattg 58

35

<210> 18

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> cebador de oligonucleótido

ES 2 661 953 T3

<400> 18
5 tgataaacga cggccagt 18
<210> 19
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> cebador de oligonucleótido
15 <400> 19
caggaaacag ctatgacc 18

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria carboxidotrófica acetogénica modificada genéticamente, aislada, que es prototrófica para tiamina, en virtud a un gen *thiC* heterólogo, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Clostridium autoethanogenum* y *Clostridium ljungdahlii*.
- 5 2. La bacteria de la reivindicación 1, en donde la bacteria es prototrófica para tiamina y pantotenato, en virtud a un gen *thiC* heterólogo y un grupo de genes *panBCD* heterólogos.
3. La bacteria de la reivindicación 2, en donde el grupo de genes *panBCD* heterólogos procede de *Clostridium beijerinckii*.
- 10 4. Un método para cultivar la bacteria de la reivindicación 1, que comprende crecer la bacteria en un medio que comprende una fuente de carbono gaseosa, en donde la fuente de carbono comprende CO y en donde el medio está desprovisto de tiamina.
5. Un método para cultivar la bacteria de la reivindicación 2, que comprende crecer la bacteria en un medio que comprende una fuente de carbono gaseosa, en donde la fuente de carbono comprende CO y en donde el medio está desprovisto de pantotenato.
- 15 6. Un método para cultivar la bacteria de la reivindicación 1, que comprende crecer la bacteria en un medio que comprende una fuente de carbono gaseosa, en donde la fuente de carbono comprende CO, y adicionalmente en donde dicha fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en gases de escape de automóvil, gas residual procedente de la fabricación de productos metálicos féreos, gas residual procedente de la fabricación de productos no féreos, gas residual procedente de procesos de refinado de petróleo, gas residual procedente de la gasificación de carbón, gas residual procedente de la producción de electricidad, gas residual procedente de la producción de negro de humo, gas residual procedente de la producción de amoníaco, gas residual procedente de la producción de metanol, gas residual procedente de la fabricación de coque, y gas de síntesis.
- 20 7. El método de la reivindicación 6, en donde la fuente de carbono comprende gas residual de acería.

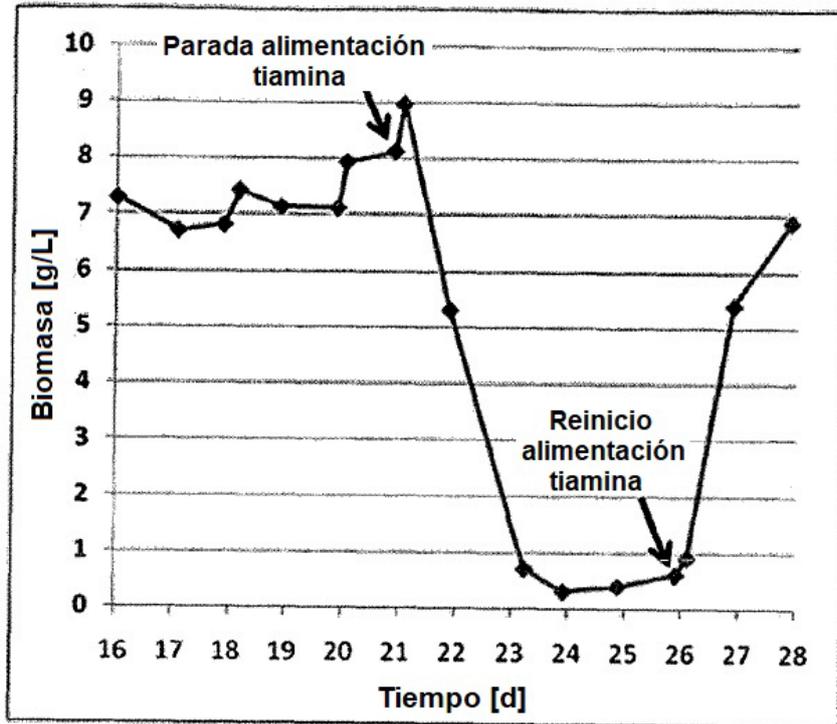


FIG. 1

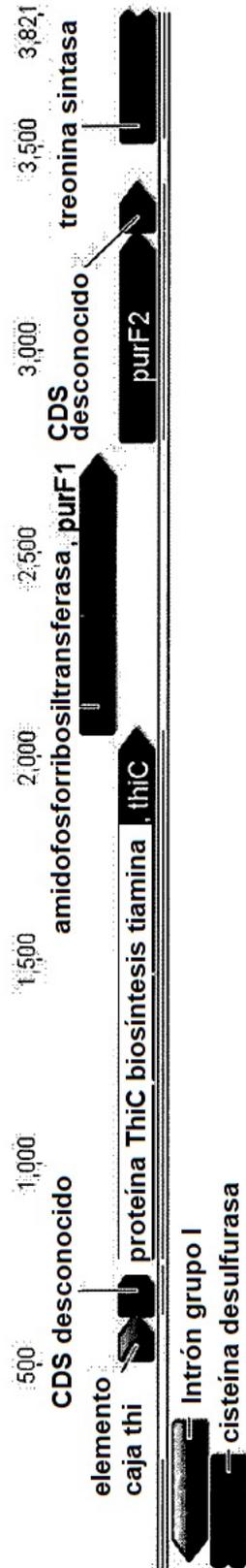


FIG 2

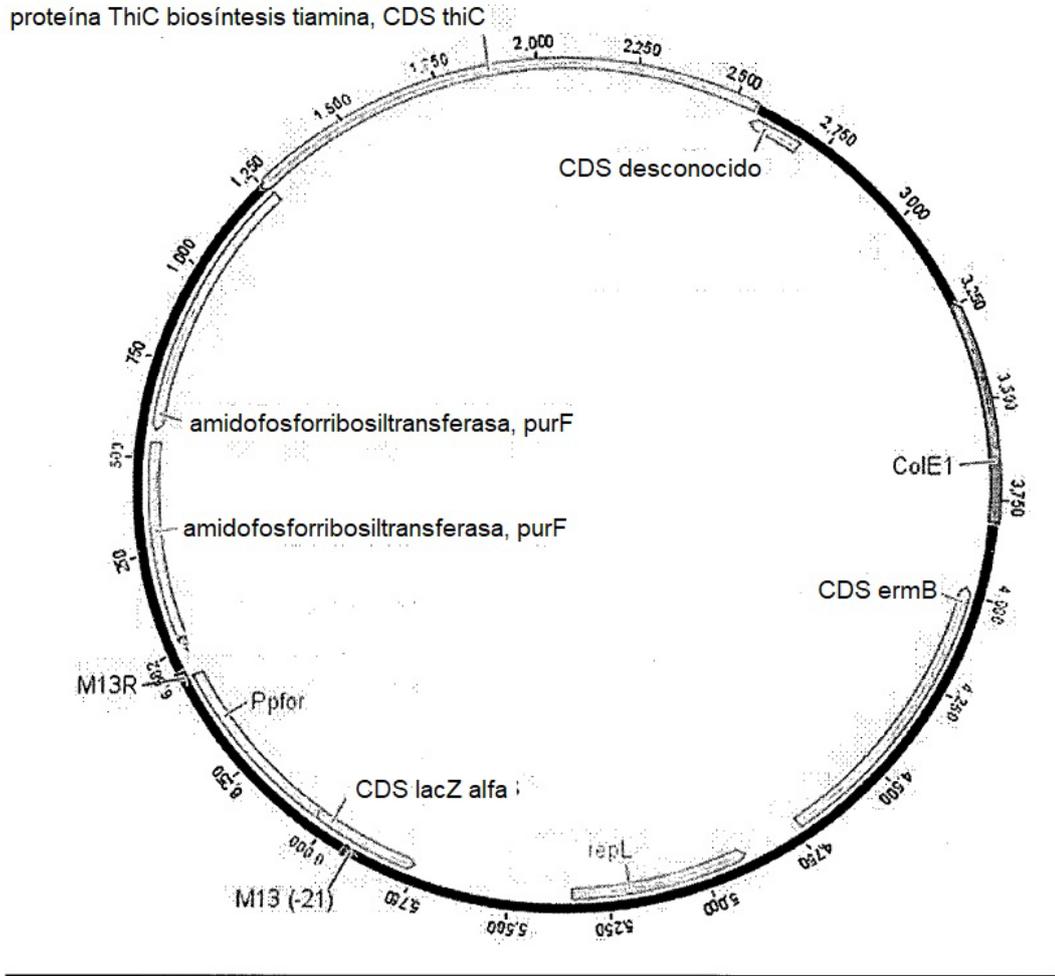


FIG. 3

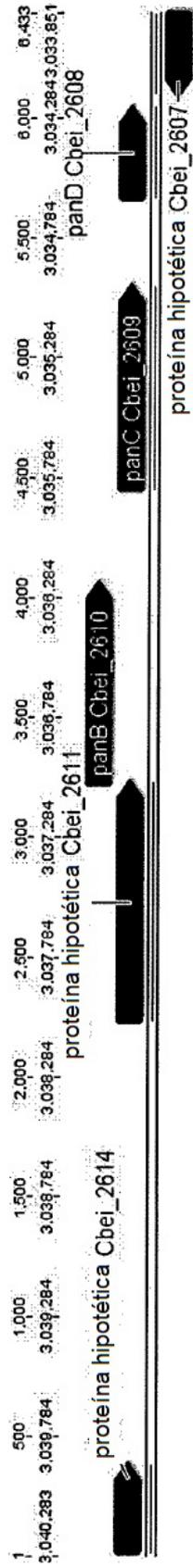


FIG. 4

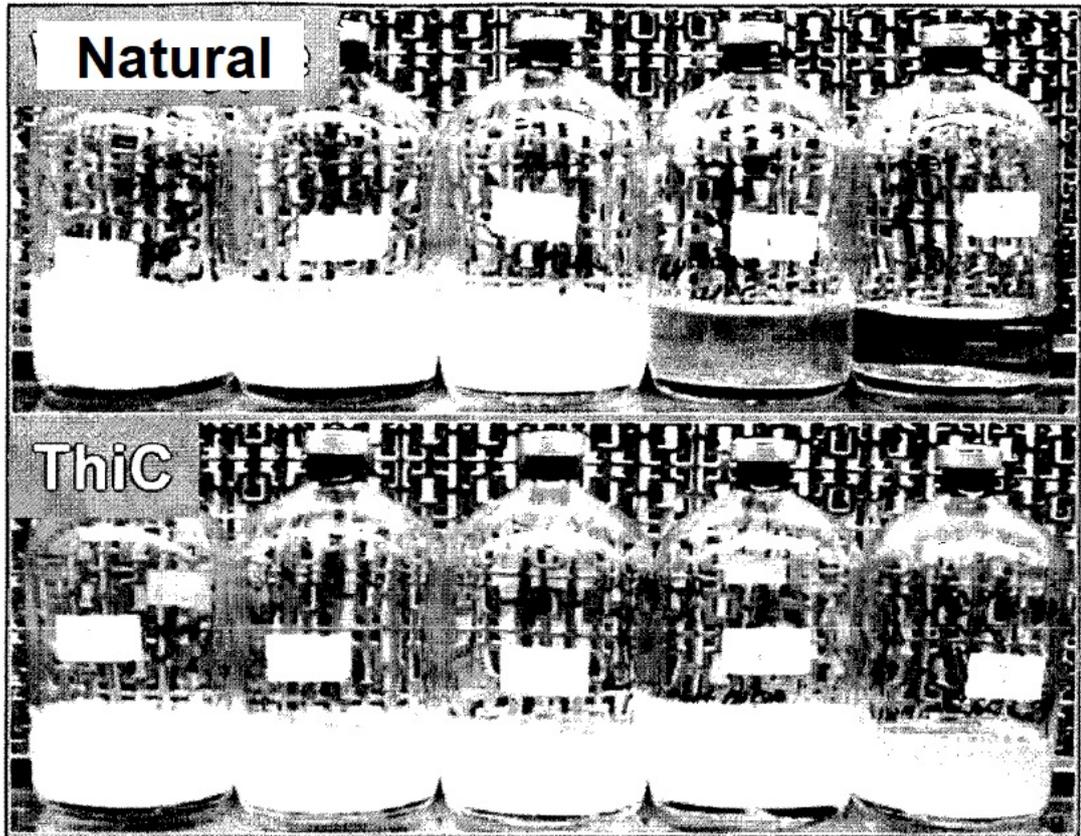


FIG. 5