

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 457**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2011 PCT/JP2011/068402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12020833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2011 E 11816495 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2604683**

54 Título: **Bacteria productora de alcohol isopropílico que tiene una productividad mejorada por destrucción de GntR**

30 Prioridad:

**07.03.2011 JP 2011049531**  
**12.08.2010 JP 2010181150**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.05.2018**

73 Titular/es:

**MITSUI CHEMICALS, INC. (100.0%)**  
**5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome Minato-ku**  
**Tokyo 105-7117, JP**

72 Inventor/es:

**AMANO, KOH;**  
**SHIRAI, TOMOKAZU;**  
**TAKAHASHI, HITOSHI;**  
**HIRANO, JUNICHIRO;**  
**MATSUMOTO, YOSHIKO;**  
**TAKEBAYASHI, NOZOMI;**  
**WADA, MITSUFUMI;**  
**SHIMIZU, HIROSHI;**  
**FURUSAWA, CHIKARA y**  
**HIRASAWA, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 668 457 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

Bacteria productora de alcohol isopropílico que tiene una productividad mejorada por destrucción de GntR

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico y a un método para producir alcohol isopropílico usando *Escherichia coli*.

10 **Antecedentes de la técnica**

El propileno es una materia prima básica importante para las resinas sintéticas como el polipropileno y para productos petroquímicos, y se usa ampliamente, como para choques de automóviles, envases de alimentos, películas e instrumentos médicos.

15 El alcohol isopropílico producido a partir de materias primas procedentes de plantas puede convertirse en propileno a través de un proceso de deshidratación. Por lo tanto, el alcohol isopropílico es una prometedora materia prima para el propileno neutra en cuanto a emisiones de carbono. La acetona también se usa ampliamente como disolventes y materias primas para plásticos. El Protocolo de Kyoto hizo un llamamiento para que las naciones industrializadas reduzcan sus emisiones totales de dióxido de carbono de los niveles de 1990 en un 5 por ciento en el período 2008-2012. Por lo tanto, el propileno neutro en cuanto a emisiones de carbono es actualmente extremadamente importante debido a su versatilidad, en vista del panorama global.

25 Ya se conocen bacterias que asimilan las materias primas procedentes de plantas y producen alcohol isopropílico. Por ejemplo, el documento WO 2009/008377 divulga una bacteria que se modifica para producir alcohol isopropílico usando glucosa como materia prima, y describe que la bacteria tiene excelentes propiedades como biocatalizador para la producción industrial debido a su alta selectividad para el alcohol isopropílico.

30 En el caso de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, debido a que la materia prima para el alcohol isopropílico es la glucosa, una gran cantidad de compuestos formados por la glucólisis y el catabolismo pueden ser subproductos. Sin embargo, estos compuestos son sustancias esenciales para el crecimiento de *Escherichia coli* en algunos casos, y, por lo tanto, la cantidad de glucosa consumida por estas reacciones secundarias no puede eliminarse por completo. Por consiguiente, se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de minimizar los subproductos y aumentar la cantidad de alcohol isopropílico producido.

35 Por ejemplo, el documento WO 2009/008377 divulga una bacteria productora de alcohol isopropílico en la que se han introducido los genes de la acetoacetato descarboxilasa, la alcohol isopropílico deshidrogenasa, la CoA transferasa y la tiolasa, y que es capaz de producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas. Se describe que la capacidad de la bacteria productora de alcohol isopropílico proporciona una tasa de producción de 0,6 g/l/h y una cantidad de acumulación de 28,4 g/l.

45 El documento WO 2009/049274 y Appl. Environ. Biotechnol., 73(24), pp.7814-7818, (2007) divulga una variante de *Escherichia coli* en la que se han introducido los genes de la acetil-CoA acetiltransferasa, la acetoacetil-CoA transferasa, la acetoacetato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa secundaria, y que produce alcohol isopropílico. Se describe que la capacidad de las bacterias proporciona una tasa de producción de 0,4 g/l/h, un rendimiento de 43,5 % y una cantidad de acumulación de 4,9 g/l.

50 El documento WO 2009/028582 divulga una variante de *Escherichia coli* en la que se han introducido los genes de la acetoacetato descarboxilasa, la alcohol isopropílico deshidrogenasa, la acetil CoA:acetato CoA-transferasa y la acetil-CoA acetiltransferasa, y que produce alcohol isopropílico. Se describe que la capacidad de la bacteria proporciona una cantidad de acumulación de 9,7 g/l.

55 En Appl. Microbiol. Biotechnol., 77 (6), pp.1219-1224, (2008) divulga una variante de *Escherichia coli* en la que se han introducido los genes de la tiolasa, la CoA-transferasa, la acetoacetato descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa primaria-secundaria, y que produce alcohol isopropílico. Se describe que la capacidad de la bacteria proporciona una tasa de producción de 0,6 g/l/h, un rendimiento del 51 % y una cantidad de acumulación de 13,6 g/l.

60 El documento WO 2009/103026 divulga una variante de *Escherichia coli* en la que se han introducido los genes de la acetoacetato descarboxilasa, la acetil CoA:acetato CoA-transferasa, la acetil-CoA acetiltransferasa y la alcohol isopropílico deshidrogenasa, y que es capaz de producir alcohol isopropílico. Se describe que se espera que la bacteria tenga una capacidad que proporcione un rendimiento del 50 %, una tasa de producción de 0,4 g/l/h y una cantidad de producción final de 14 g/l.

65 El documento WO 2009/247217 desvela una variante de *Escherichia coli* en la que se han introducido los genes de la acetoacetato descarboxilasa, la CoA transferasa, la tiolasa y la 2-propil alcohol deshidrogenasa, y que es capaz de producir alcohol isopropílico. Se describe que la capacidad de la bacteria proporciona una cantidad de producción

final de 2 g/l.

Aquí, la alcohol isopropílico deshidrogenasa, la alcohol deshidrogenasa secundaria, la alcohol deshidrogenasa primaria-secundaria y la 2-propil alcohol deshidrogenasa son enzimas que tienen diferentes nombres pero catalizan la misma reacción. La CoA transferasa, la acetoacetyl-CoA transferasa, la acetyl CoA:acetato CoA-transferasa y la CoA transferasa son enzimas que tienen diferentes nombres pero que catalizan la misma reacción. La ácido acetoacético descarboxilasa y la acetoacetato descarboxilasa son enzimas que tienen diferentes nombres pero que catalizan la misma reacción. La tiolasa y la acetyl-CoA acetyltransferasa son enzimas que tienen diferentes nombres pero que catalizan la misma reacción. En consecuencia, aunque la productividad de las variantes de *Escherichia coli* productoras de alcohol isopropílico divulgadas en estos documentos varía, las enzimas utilizadas para producir alcohol isopropílico son equivalentes a los cuatro tipos de enzimas de acetoacetato descarboxilasa, alcohol isopropílico deshidrogenasa, CoA transferasa y tiolasa, que se describen en el documento WO 2009/008377. En este caso en el que se desea mejorar la productividad o el rendimiento, hasta el momento se han examinado estos cuatro tipos de enzimas.

La Solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública (JP-A) N.º 5-260979 describe que, en *Bacillus subtilis*, la alteración del gen GntR poseído por *Escherichia coli* mejora la producción de D-ribosa.

Además, con respecto a un método para convertir alcohol isopropílico en acetona, en los documentos JP-A N.º 7-53433 y JP-A N.º 11-335315 se utiliza un catalizador a base de cobre como catalizador sólido para la producción de acetona a través de la deshidrogenación del alcohol isopropílico. Además, en la Patente del Reino Unido N.º GB665376 se utiliza un catalizador obtenido por mezcla física de partículas finas de óxido de zinc y partículas finas de óxido de zirconio. Se sabe que cuando se produce una sustancia usando un microorganismo generalmente hay presente impurezas. En este sentido, ninguna de estas técnicas es un método de producción que utilice microorganismos y, por lo tanto, no describe que el isopropanol que contiene impurezas se use como materia prima.

La acetona se puede convertir fácilmente en isopropanol por hidrogenación. Se ha propuesto un proceso (véase, por ejemplo, el documento JP-A N.º 2-174737) que incluye la obtención de propileno a partir del isopropanol a través de una reacción de deshidratación, y posteriormente obtener cumeno permitiendo que el propileno reaccione con el benceno, es decir, un proceso en el cual la acetona se reutiliza como materia prima para el método del cumeno al convertirse en propileno mediante reacciones en dos etapas.

En la reutilización tal como se describió anteriormente, existe la necesidad de establecer un método industrial y práctico para producir propileno a partir de acetona con alta selectividad. También se conoce un método (véase, por ejemplo, la Patente de Alemania Oriental N.º DD84378) que incluye llevar a cabo una reacción de hidrogenación de acetona a 400 °C en presencia de un catalizador de Cu (25 %) - óxido de zinc (35 %) - óxido de aluminio (40 %) para obtener propileno. Sin embargo, aunque la temperatura de reacción en este método es alta (400 °C), la tasa de conversión de acetona es baja (89 %). Además, dado que en el método se produce una reacción secundaria que genera propano a través de la hidrogenación de propileno, la selectividad del propileno también es insuficiente (89 %).

## Sumario de la invención

### Problema técnico

Sin embargo, ninguna de las variantes de *Escherichia coli* descritas anteriormente capaces de producir alcohol isopropílico tienen una capacidad de producción completamente satisfactoria. Mejorar la eficiencia en la producción de alcohol isopropílico en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico ha sido un objetivo importante para lograr. Además, también se ha deseado la provisión de un método para la utilización eficaz del alcohol isopropílico obtenido.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una *Escherichia coli* que tenga una eficiencia significativa de producción de alcohol isopropílico, un método de producción de alcohol isopropílico y un método de producción de acetona que utiliza la *Escherichia coli*, así como un método de producción de propileno a partir de alcohol isopropílico que contenga acetona y que se obtenga utilizando la *Escherichia coli*

### Solución al problema

La presente invención se realizó a la vista de las circunstancias descritas anteriormente. Una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención, un método de producción de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención, y un método de producción de acetona de acuerdo con la presente invención son como se describe a continuación.

[1] Una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que comprende un sistema de producción de alcohol isopropílico, en el que se inactiva una actividad del represor transcripcional GntR para mejorar la eficacia de la producción de alcohol isopropílico y la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico comprende un grupo de

enzimas auxiliares que tienen un patrón de expresión de la actividad enzimática con el que se mantiene o aumenta la capacidad de producción de alcohol isopropílico conseguida mediante la inactivación de la actividad de GntR, seleccionándose el patrón de actividad enzimática del grupo de enzimas auxiliares del grupo que consiste en:

- 5
- (1) mantenimiento de las actividades de tipo silvestre de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi), la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) y la actividad fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd);
  - (2) inactivación de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) y aumento de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf); e
  - 10 (3) inactivación de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi), aumento de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) e inactivación de la actividad fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd), y

en el que el sistema de producción de alcohol isopropílico está constituido por genes de las enzimas acetoacetato descarboxilasa, alcohol isopropílico deshidrogenasa, CoA transferasa y tiolasa.

15 [2] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con [1], en la que la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) es una actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa codificada por un gen de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa de una bacteria del género *Escherichia*.

[3] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con [1] o [2], en la que:

- 20
- (a) el gen de la enzima acetoacetato descarboxilasa es un gen de la acetoacetato descarboxilasa de un procarionta seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*,
  - (b) el gen de la enzima alcohol isopropílico deshidrogenasa es un gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa de un procarionta seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*,
  - 25 una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*,
  - (c) el gen de la enzima de la CoA transferasa es un gen de la CoA transferasa de un procarionta seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*, y
  - (d) el gen de la enzima tiolasa es un gen de la tiolasa de un procarionta seleccionado del grupo que consiste
  - 30 en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*.

[4] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con [1] o [3], en la que:

- 35
- (a) la actividad acetoacetato descarboxilasa es una actividad acetoacetato descarboxilasa codificada por un gen que codifica la acetoacetato descarboxilasa de *Clostridium acetobutylicum*,
  - (b) la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa es una actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa codificada por un gen que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa procedente de *Clostridium beijerinckii*,
  - 40 (c) la actividad CoA transferasa es una actividad CoA transferasa codificada por un gen que codifica la CoA transferasa de *Escherichia coli*, y
  - (d) la actividad tiolasa es una actividad tiolasa codificada por un gen que codifica la tiolasa de *Escherichia coli*.

45 [5] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con [1], en la que:

- (a) la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa es una actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa codificada por un gen que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa introducida como un gen modificado, y/o
- 50 (b) la actividad acetoacetato descarboxilasa es una actividad la acetoacetato descarboxilasa codificada por un gen que codifica la acetoacetato descarboxilasa introducida como un gen modificado.

[6] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con [5], en la que el gen modificado de la alcohol isopropílico deshidrogenasa tiene una secuencia de bases de SEQ ID NO: 40, y el gen modificado de la acetoacetato descarboxilasa tiene una secuencia de bases de SEQ ID NO: 43.

55 [7] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con cualquiera de [1] y [3] a [6], que comprende además al menos un gen de sacarosa hidrolasa de entre los genes de sacarosa no PTS.

[8] Un método de producción de alcohol isopropílico, que comprende la producción de alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas usando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico cualquiera de [1] a [7].

60 [9] Un método para producir acetona, que comprende:

- obtener alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de cualquiera de [1] a [7]; y
- 65 poner en contacto el alcohol isopropílico obtenido con un óxido complejo como catalizador que incluye óxido de zinc y al menos un óxido que contiene un elemento del Grupo 4, y que se prepara por coprecipitación.

[10] Un método para producir propileno, que comprende:

obtener alcohol isopropílico que contiene acetona a partir de una materia prima procedente de plantas utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de cualquiera de [1] a [7] y poner en contacto el alcohol isopropílico con una sustancia ácida sólida y un catalizador de hidrogenación que contiene Cu como catalizadores, a una temperatura de reacción dentro de un intervalo de 50 a 300 °C.

[11] El método para producir propileno de acuerdo con [10], en el que el catalizador de hidrogenación que contiene Cu es un catalizador que incluye además al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en elementos del Grupo 6, Grupo 12 y Grupo 13.

[12] El método para producir propileno de acuerdo con [10] u [11], en el que la sustancia ácida sólida es zeolita.

### Efecto ventajoso de la invención

De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar una *Escherichia coli* que tiene una eficiencia significativa de producción de alcohol isopropílico, un método de producción de alcohol isopropílico y un método de producción de acetona que utilizan la *Escherichia coli*, así como un método de producción de propileno a partir de alcohol isopropílico que contiene acetona y que se obtiene utilizando la *Escherichia coli*.

### Descripción de las realizaciones

Una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de la presente invención es un *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que comprende un sistema de producción de alcohol isopropílico, en el que la actividad del represor transcripcional GntR se inactiva para mejorar la eficacia de la producción de alcohol isopropílico y la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico comprende un grupo de enzimas auxiliares que tienen un patrón de actividad enzimática con el que se mantiene o aumenta la capacidad de producción de alcohol isopropílico conseguida mediante la inactivación de la actividad GntR.

En la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención, la inactivación de la actividad GntR en combinación con la posesión de un grupo de enzimas auxiliares que tienen el patrón de actividad enzimática especificado permite una alta producción de alcohol isopropílico.

Es decir, como resultado de diversos estudios que apuntan a mejorar la eficacia de la producción de alcohol isopropílico, la invención ha descubierto que la inactivación de la actividad de GntR, que es un regulador negativo del metabolismo del gluconato, mejora la eficacia de la producción de alcohol isopropílico por la *Escherichia coli*.

Además, también se encontró que hay enzimas que afectan a la capacidad mejorada de producción de alcohol isopropílico lograda por la inactivación de la actividad GntR. La capacidad mejorada de producción de alcohol isopropílico conseguida por la inactivación de GntR se mantiene o aumenta, dependiendo del patrón de actividad de estas enzimas.

Como se usa en la invención, la expresión "grupo de enzimas auxiliares" se refiere a enzimas que afectan a la capacidad de producción de alcohol isopropílico. Además, la actividad de enzimas incluidas en el grupo de enzimas auxiliares se inactiva, activa o aumenta, y la frase "patrón de actividad enzimática del grupo de enzimas auxiliares" como se usa en la invención se refiere a un patrón de actividad enzimática de las enzimas que es capaz de mantener o aumentar la cantidad de producción mejorada de alcohol isopropílico conseguida mediante la inactivación de la actividad de GntR sola. El patrón de actividad enzimática se selecciona del grupo que consiste en:

(1) mantenimiento de las actividades de tipo silvestre de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi), actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) y actividad fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd);

(2) inactivación de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) y aumento de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf); e

(3) inactivación de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi), aumento de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) e inactivación de la actividad fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd).

El grupo de enzimas auxiliares puede ser un grupo de enzimas compuesto solo de enzimas nativas excepto que se proporciona un sistema de producción de alcohol isopropílico constituido por genes de las enzimas acetoacetato descarboxilasa, alcohol isopropílico deshidrogenasa, CoA transferasa y tiolasa, y que la actividad GntR está inactivada (en la invención, los factores que no muestran actividad enzimática por sí mismos también se incluyen en el alcance de "enzimas", a menos que se indique específicamente que se excluyen).

El alcance de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico descrito anteriormente abarca, por ejemplo:

la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en la que no se realiza ninguna alteración artificial, excepto que se proporciona el sistema de producción de alcohol isopropílico que ejerce la capacidad de producción de alcohol isopropílico predeterminada, y que GntR se inactivó mediante tecnología de recombinación génica; y

la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en la que no se realiza ninguna alteración artificial, excepto que se proporciona el sistema de producción de alcohol isopropílico modificado para mejorar la capacidad de producción de alcohol isopropílico, y que GntR se inactiva mediante tecnología de recombinación génica.

5 El patrón de actividad enzimática del grupo de enzimas auxiliares descrito en el punto (3) anterior es más preferible desde el punto de vista de la capacidad de producción de alcohol isopropílico.

10 Como se usa en la invención, el término "inactivación" se refiere a una condición en la que la actividad del factor o enzima medida por cualquier sistema de medición existente no es superior a 1/10 de la actividad en la *Escherichia coli* antes de la inactivación, suponiendo que la actividad en la *Escherichia coli* antes de la inactivación es 100.

15 Como se usa en la invención, la frase "mediante tecnología de recombinación genética" abarca cualquier alteración de la secuencia de bases causada por la inserción de otro ADN en la secuencia de bases de un gen nativo, la sustitución o eliminación de un determinado sitio de un gen, o combinación de los mismos. Por ejemplo, la alteración puede ser el resultado de una mutación.

20 En la invención, *Escherichia coli* en la que la actividad de un factor o enzima se inactiva se refiere a una bacteria en la que la actividad nativa se ve afectada por algún método aplicado desde el exterior de la célula bacteriana hacia el interior de la célula bacteriana. La bacteria puede generarse, por ejemplo, alterando un gen que codifica la proteína o enzima (interrupción del gen).

25 Los ejemplos de la alteración génica en la invención incluyen la adición de una mutación a la secuencia de bases de un gen, la inserción de otro ADN en la secuencia de bases y la eliminación de una cierta parte de un gen, que se llevan a cabo con el fin de prevenir la función del gen a realizar. Como resultado de la alteración génica, por ejemplo, el gen no puede transcribirse en ARNm, y el gen estructural deja de traducirse. En otra alternativa, debido a que el ARNm transcrito está incompleto, la mutación o delección aparece en la secuencia de aminoácidos de la proteína estructural traducida, y por lo tanto, no pueden realizarse las funciones intrínsecas de la proteína estructural.

30 Se puede emplear cualquier método para la preparación de un alterador génico siempre que se obtenga un alterador en el que la enzima o proteína no se expresa. Se han descrito varios métodos de alteración génica (reproducción natural, adición de un agente mutagénico, irradiación ultravioleta, exposición a radiación, mutagénesis aleatoria, transposón, alteración génica dirigida al sitio). La alteración génica por recombinación homóloga es preferible debido a su capacidad de alterar solo un gen específico. Las técnicas por recombinación homóloga se describen en J. Bacteriol., 161, 1219 - 1221 (1985), J. Bacteriol., 177, 1511-1519 (1995) y Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97,6640-6645 (2000), y los expertos en la materia pueden llevar a cabo fácilmente la alteración génica usando estos métodos y aplicaciones de los mismos.

35 En la invención, el "aumento" de "actividad" significa, en términos generales, que una actividad enzimática en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico aumenta después del aumento en comparación con la actividad de la enzima antes del aumento.

45 Los métodos de aumento no están particularmente restringidos siempre que la actividad de una enzima poseída por la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico aumente. Los ejemplos de los mismos incluyen el aumento mediante un gen de una enzima introducido desde el exterior de la célula bacteriana, aumento por expresión aumentada de un gen de una enzima dentro de la célula bacteriana, y una combinación de los mismos.

50 Los ejemplos de aumento por un gen de una enzima introducido desde el exterior de la célula bacteriana incluyen, específicamente: la introducción de un gen que codifica una enzima que tiene una actividad mayor que la enzima del hospedador desde el exterior de la célula bacteriana de la bacteria hospedadora hacia dentro de la célula bacteriana, añadiendo así el actividad enzimática del gen de la enzima introducido; sustituir la actividad enzimática introducida por una actividad enzimática intrínseca que posee originalmente el hospedador; aumentar el número de copias de un gen de una enzima del hospedador o un gen de una enzima introducido desde el exterior de la célula bacteriana a 2 o más; y cualquier combinación de los mismos.

55 Los ejemplos de aumento por expresión aumentada de un gen de una enzima dentro de la célula bacteriana incluyen, específicamente: la introducción de una secuencia de bases que aumenta la expresión de un gen de una enzima desde el exterior de la célula bacteriana de la bacteria hospedadora hacia dentro de la célula bacteriana; la sustitución de otro promotor por el promotor de un gen de una enzima que posee la bacteria hospedadora en su genoma, aumentando así la expresión del gen de la enzima; y cualquier combinación de los mismos.

60 En la invención, el término "hospedadora" significa *Escherichia coli* que se convertirá en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención como resultado de la introducción de uno o más genes desde el exterior de la célula de la misma.

65 La invención se describe a continuación.

GntR en la invención se refiere a un factor de transcripción que regula negativamente un operón que participa en el metabolismo de gluconato a través de la vía Entner-Doudoroff, y es un nombre genérico para el represor transcripcional GntR que suprime las funciones de dos grupos de genes (GntI y GntII), que son responsables de la absorción y del metabolismo del ácido gluconico.

Glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) en la invención se refiere a un nombre genérico de enzimas que están clasificadas con el código de enzima número 5.3.1.9 basado en el informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), y que cataliza una reacción de producción de D-fructosa-6-fosfato a partir de D-glucosa-6-fosfato.

Glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) en la invención se refiere a un nombre genérico de enzimas que están clasificadas con el código de enzima número 1.1.1.49 basado en el informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), y que catalizan una reacción de producción de D-glucono-1,5-lactona-6-fosfato a partir de D-glucosa-6-fosfato.

Ejemplos de tales enzimas incluyen las procedentes de bacterias del género *Deinococcus* como *Deinococcus radiophilus*, bacterias del género *Aspergillus* como *Aspergillus niger* y *Aspergillus aculeatus*, bacterias del género *Acetobacter* como *Acetobacter hansenii*, bacterias del género *Thermotoga* como *Thermotoga maritima*, bacterias del género *Cryptococcus* como *Cryptococcus neoformans*, bacterias del género *Dictyostelium* como *Dictyostelium discoideum*, el género *Pseudomonas* como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, el género *Saccharomyces* como *Saccharomyces cerevisiae*, bacterias del género *Bacillus* como *Bacillus megaterium*, y bacterias del género *Escherichia* como *Escherichia coli*.

Como gen de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) usado en la invención, se puede utilizar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica una glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de las enzimas descritos anteriormente, o la secuencia de ADN sintético que se sintetiza basado en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos preferibles incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una bacteria del género *Deinococcus* como *Deinococcus radiophilus*, una bacteria del género *Aspergillus* como *Aspergillus niger* o *Aspergillus aculeatus*, una bacteria del género *Acetobacter* como *Acetobacter hansenii*, una bacteria del género *Thermotoga* como *Thermotoga maritima*, una bacteria del género *Cryptococcus* como *Cryptococcus neoformans*, una bacteria del género *Dictyostelium* como *Dictyostelium discoideum*, el género *Pseudomonas* como *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas aeruginosa*, el género *Saccharomyces* como *Saccharomyces cerevisiae*, una bacteria del género *Bacillus* como *Bacillus megaterium*, o una bacteria del género *Escherichia* como *Escherichia coli*. Un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de un procarionta tal como una bacteria del género *Deinococcus*, una bacteria del género *Aspergillus*, una bacteria del género *Acetobacter*, una bacteria del género *Thermotoga*, una bacteria del género *Pseudomonas*, una bacteria del género *Bacillus* o una bacteria del género *Escherichia* es más preferible, y un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de *Escherichia coli* es particularmente preferible.

La fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd) en la invención se refiere a un nombre genérico de enzimas que están clasificadas con el código de enzima número 1.1.1.44 basado en el informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), y que cataliza una reacción de producción de D-ribulosa-5-fosfato y CO<sub>2</sub> a partir de 6-fosfo-D-gluconato.

La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención es *Escherichia coli* que tiene un sistema de producción de alcohol isopropílico, y tiene capacidad de producción de alcohol isopropílico que se introduce o altera mediante una tecnología de recombinación génica. El sistema de producción de alcohol isopropílico es un sistema que habilita el objetivo *Escherichia coli* para producir alcohol isopropílico

En la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención, se confieren cuatro tipos de actividades enzimáticas, actividad acetoacetato descarboxilasa, actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa descrita anteriormente desde el exterior de la célula bacteriana, o se aumenta la expresión de las actividades en la célula bacteriana, o, más preferiblemente, se confieren y se aumentan.

En la invención, tiolasa se refiere a un nombre genérico de enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 2.3.1.9 basado en el informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) y que cataliza una reacción de producción de acetoacetilo CoA a partir de acetil CoA.

Los ejemplos de la enzima incluyen las procedentes de las bacterias del género *Clostridium* como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, bacterias del género *Escherichia* como *Escherichia coli*, bacterias del género *Halobacterium*, bacterias del género *Zoogloea* como *Zoogloea ramigera*, bacterias del género *Rhizobium*, bacterias del género *Bradyrhizobium* como *Bradyrhizobium japonicum*, bacterias del género *Candida* como *Candida tropicalis*, bacterias del género *Caulobacter* como *Caulobacter crescentus*, bacterias del género *Streptomyces* como *Streptomyces collinus*, y bacterias del género *Enterococcus* como *Enterococcus faecalis*.

Como un gen de la tiolasa para usar en la invención, se puede usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica una tiolasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de las enzimas enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintetizada que se sintetiza basándose en una secuencia de bases del gen conocida. Los ejemplos preferibles incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una bacteria del género *Clostridium* como *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii*, una bacteria del género *Escherichia* como *Escherichia coli*, una bacteria de la especie *Halobacterium*, una bacteria del género *Zoogloea* como *Zoogloea ramigera*, una bacteria de la especie *Rhizobium*, una bacteria del género *Bradyrhizobium* como *Bradyrhizobium japonicum*, una bacteria del género *Candida* como *Candida tropicalis*, una bacteria del género *Caulobacter* como *Caulobacter crescents*, una bacteria del género *Streptomyces* como *Streptomyces collinus*, o una bacteria del género *Enterococcus* como *Enterococcus faecalis*. Los ejemplos más preferibles incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de un procarionta tal como una bacteria del género *Clostridium* o una bacteria del género *Escherichia*, y un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli* es particularmente preferible.

En la invención, la acetoacetato descarboxilasa se refiere a un nombre genérico de enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 4.1.1.4 basado en el informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), y que cataliza una reacción de producción de acetona a partir de acetoacetato.

Los ejemplos de las enzimas incluyen las procedentes de las bacterias del género *Clostridium*, como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, y bacterias del género *Bacillus* como *Bacillus polymyxa*.

Como un gen de la acetoacetato descarboxilasa a introducir en la bacteria hospedadora en la invención, se puede usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica una acetoacetato descarboxilasa obtenida a partir de cualquiera de los organismos de origen de las enzimas enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza basándose en una secuencia base conocida del gen. Los ejemplos preferibles incluyen los procedentes de bacterias del género *Clostridium* o bacterias del género *Bacillus*. Un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de *Clostridium acetobutylicum* o *Bacillus polymyxa*. Un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de *Clostridium acetobutylicum* es particularmente preferible.

En la invención, la alcohol isopropílico deshidrogenasa se refiere a un nombre genérico de enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 1.1.1.80 basado en el informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), y que cataliza una reacción de producción de alcohol isopropílico a partir de acetona. Los ejemplos de la enzima incluyen las procedentes de las bacterias del género *Clostridium*, como *Clostridium beijerinckii*.

Como un gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa para ser introducido en la bacteria hospedadora en la invención, se puede usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica una alcohol isopropílico deshidrogenasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de las enzimas enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos preferibles incluyen los procedentes de bacterias del género *Clostridium*, como un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de *Clostridium beijerinckii*.

En la invención, CoA transferasa se refiere a un nombre genérico de enzimas que se clasifican con el número de código de enzima: 2.8.3.8 basado en el informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) y que cataliza una reacción de producción de acetoacetato a partir de acetoacetil CoA.

Los ejemplos de la enzima incluyen las procedentes de las bacterias del género *Clostridium*, como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, bacterias del género *Roseburia*, como *Roseburia intestinalis*, bacterias del género *Faecalibacterium* como *Faecalibacterium prausnitzii*, bacterias del género *Coprococcus*, *Trypanosoma* como *Trypanosoma brucei*, y bacterias del género *Escherichia* como *Escherichia coli*.

Como un gen de la CoA transferasa para usar en la invención, se puede usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica una CoA transferasa obtenida de cualquiera de los organismos de origen de las enzimas enumerados anteriormente, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos preferibles incluyen un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una bacteria del género *Clostridium* como *Clostridium acetobutylicum*, una bacteria del género *Roseburia* como *Roseburia intestinalis*, una bacteria del género *Faecalibacterium* como *Faecalibacterium prausnitzii*, una bacteria del género *Coprococcus*, *Trypanosoma* como *Trypanosoma brucei*, o una bacteria del género *Escherichia* como *Escherichia coli*. Los ejemplos más preferibles incluyen los procedentes de una bacteria del género *Clostridium* o una bacteria del género *Escherichia*, y un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli* es particularmente preferible.

Desde el punto de vista de la actividad de la enzima, es preferible que cada uno de los cuatro tipos de enzima sea una enzima procedente de al menos una seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus*, y una bacteria del género *Escherichia*. En particular, un caso en el que la acetoacetato descarboxilasa y la alcohol isopropílico deshidrogenasa se derivan de una bacteria o bacteria del

género *Clostridium*, y en la cual la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se derivan de una bacteria o bacterias del género *Escherichia*, es más preferible

5 En particular, desde el punto de vista de la actividad enzimática, es preferible que cada uno de los cuatro tipos de enzima en la invención proceda de cualquiera de *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, o *Escherichia coli*. Un caso en el que la acetoacetato descarboxilasa es una enzima procedente de *Clostridium acetobutylicum*, y en la que cada una de la CoA transferasa y la tiolasa es una enzima procedente de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli*, y en la cual la alcohol isopropílico deshidrogenasa es una enzima procedente de *Clostridium beijeerinckii*, es más preferible. Con respecto a los cuatro tipos de enzimas, un caso en el cual la actividad  
10 acetoacetato descarboxilasa se deriva de *Clostridium acetobutylicum*, y en la cual la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa se deriva de *Clostridium beijeerinckii*, y en la cual la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se derivan de *Escherichia coli*, es particularmente preferible desde el punto de vista de la actividad de la enzima.

15 Cada una de las actividades de estas enzimas en la invención puede ser una actividad introducida desde el exterior de la célula bacteriana dentro de la célula bacteriana o una actividad obtenida por la elevada expresión del gen de la enzima que la bacteria hospedadora posee en su genoma a través del aumento de la actividad del promotor para el gen de la enzima o reemplazo del promotor con otro promotor.

20 La introducción de la actividad enzimática puede llevarse a cabo, por ejemplo, introduciendo un gen que codifica la enzima desde el exterior de la célula bacteriana de la bacteria hospedadora hasta el interior de la célula bacteriana utilizando una tecnología de recombinación génica. Aquí, el gen de la enzima que se va a introducir puede derivarse de la misma especie que la de la célula hospedadora o de una especie diferente de la de la célula hospedadora. Métodos para la preparación de un ADN genómico necesario para introducir un gen desde el exterior de la célula bacteriana hasta el interior de la célula bacteriana, corte y ligación del ADN, transformación, PCR (reacción en  
25 cadena de la polimerasa), diseño y síntesis de oligonucleótidos para ser utilizados como cebadores, etc. pueden llevarse a cabo mediante métodos habituales bien conocidos por los expertos en la materia. Estos métodos se describen en Sambrook, J., et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) etc.

30 En la invención, la *Escherichia coli* en la cual se aumenta una actividad de la enzima se refiere a *Escherichia coli* en la cual la actividad enzimática se aumenta mediante algún método. Tal *Escherichia coli* pueden prepararse utilizando, por ejemplo, un método en el que un gen que codifica la enzima o proteína se introduce desde el exterior de la célula bacteriana hasta el interior de la célula bacteriana utilizando un plásmido y una tecnología de recombinación génica similar a la descrita anteriormente, un método en el que la elevada expresión de un gen de la  
35 enzima que posee la *Escherichia coli* hospedadora en su genoma se logra mediante el aumento de la actividad promotora para el gen de la enzima o la sustitución del promotor por otro promotor.

40 El promotor del gen en la invención puede ser cualquier promotor que sea capaz de controlar la expresión de cualquiera de los genes descritos anteriormente. El promotor del gen es preferiblemente un potente promotor que funciona constitutivamente en el microorganismo, y que no es susceptible a la represión de la expresión incluso en presencia de glucosa. Los ejemplos específicos del mismo incluyen el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (en lo sucesivo denominado en ocasiones "GAPDH") o el promotor de la serina hidroximetil transferasa.

45 El promotor en la presente invención significa una región a la que se une una ARN polimerasa que tiene un factor sigma para iniciar la transcripción. Por ejemplo, un promotor GAPDH procedente de *Escherichia coli* se describe en las bases número 397-440 en la información de la secuencia de bases con número de acceso de GenBank X02662.

50 Los genes de la CoA transferasa (atoD y atoA) y un gen de la tiolasa (atoB), cada uno de los cuales se deriva de *Escherichia coli*, forman un operón en el genoma de *Escherichia coli* en el orden de atoD, atoA y atoB (Journal of Bacteriology vol. 169 pp 42-52 Lauren Sallus Jenkins, et al.) Por lo tanto, la expresión de los genes de la CoA transferasa y el gen de la tiolasa puede controlarse simultáneamente modificando el promotor de atoD.

55 En vista de lo anterior, cuando la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen de los genes genómicos de la *Escherichia coli* hospedadora, es preferible aumentar la expresión de ambos genes de las enzimas, por ejemplo, reemplazando el promotor responsable de la expresión de ambos genes de las enzimas por otro promotor, desde el punto de vista de obtener suficiente capacidad de producción de alcohol isopropílico. Los ejemplos del promotor que se usan para aumentar la expresión de la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa incluyen el promotor GAPDH procedente de *Escherichia coli* anteriormente descrito.

60 En la presente invención, ejemplos de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que tienen un sistema de producción de alcohol isopropílico incluyen la variante pIPA/B o la variante plaaa/B descritas en el documento WO 2009/008377. El alcance de tal *Escherichia coli* incluye una variante en la que, entre las enzimas implicadas en la producción de alcohol isopropílico, el aumento de la actividad de la CoA transferasa y de la actividad tiolasa se lleva a  
65 cabo aumentando la expresión de los respectivos genes en el genoma de la *Escherichia coli*, y en el que el aumento de la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa y la actividad acetoacetato descarboxilasa se lleva a cabo

mediante el aumento de la expresión de los genes respectivos usando un plásmido o plásmidos (a veces denominada “variante pla/B::atoDAB”).

En la invención, la actividad GntR inactivada se incluye preferiblemente desde el punto de vista de mejorar más eficazmente la eficacia de la producción de alcohol isopropílico. Es más preferible incluir la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) inactivada y la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) aumentada además de la GntR inactivada. Lo más preferible es que se incluyan la actividad GntR inactivada, la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) inactivada, la actividad fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd) inactivada y la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) aumentada. Estas combinaciones permiten una mejora drástica de la eficacia de la producción de alcohol isopropílico, en comparación con otras combinaciones de factores o enzimas.

Un aspecto preferible de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención es una variante obtenida mediante la inactivación de la actividad GntR de la variante pIPA/B, la variante plaaa/B o la variante pla/B::atoDAB.

Un aspecto más preferible de la misma es una variante obtenida mediante la inactivación de la actividad GntR y la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) de la variante pIPA/B, la variante plaaa/B o la variante pla/B::atoDAB, y el aumento de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) de la misma.

Un aspecto particularmente preferible es una variante obtenida mediante la inactivación de la actividad GntR, la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) y la actividad fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd) de la variante pIPA/B, la variante plaaa/B o la variante pla/B::atoDAB, y el aumento de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) de la misma.

Además, los genes que codifican enzimas de asimilación de sacarosa pueden introducirse en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención. La introducción de tales genes permite la producción de alcohol isopropílico a partir de sacarosa.

Los genes que codifican enzimas de asimilación de sacarosa incluyen genes que codifican enzimas implicadas en el sistema PTS y el sistema no PTS entre las vías de asimilación de sacarosa de microorganismos.

Específicamente, ejemplos de genes que codifican enzimas implicadas en el sistema PTS de la sacarosa incluyen genes que codifican ScrA (que incorpora sacarosa), ScrY (que fosforila sacarosa), ScrB (que degrada la sacarosa dentro del microorganismo), ScrR (que regula la expresión de genes que codifican ScrA, Y, y B), y ScrK (que fosforila la fructosa).

Además, un grupo de genes no PTS de sacarosa que codifica las enzimas implicadas en el sistema no PTS de sacarosa es, específicamente, un grupo de genes compuestos por genes que codifican CscB (sacarosa permeasa, que incorpora sacarosa), CscA (sacarosa hidrolasa, que degrada sacarosa dentro del microorganismo), CscK (fructoquinasa, que fosforila la fructosa) y CscR (proteína represora, que regula la expresión de genes que codifican CscB, A y K).

Entre estos, ejemplos de un gen de una enzima de asimilación de sacarosa para ser introducido en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención incluyen genes que codifican enzimas implicadas en el sistema no PTS, y, especialmente, genes que codifican una combinación de una o más enzimas que incluyen al menos CscA. Los ejemplos de los mismos incluyen cscA solo, una combinación de cscA y cscK, una combinación de cscA y cscB, una combinación de cscA y cscR, una combinación de cscA, cscR y cscK, y una combinación de cscA, cscR y cscB. En particular, es posible elegir introducir solo un gen que codifica CscA desde el punto de vista de la producción eficiente de alcohol isopropílico.

Como un gen de la sacarosa hidrolasa (invertasa, CscA), se puede usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica una sacarosa hidrolasa (invertasa, CscA) obtenida de un organismo que posee la enzima, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza basándose en la secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos preferibles incluyen los procedentes de bacterias del género *Erwinia*, bacterias del género *Proteus*, bacterias del género *Vibrio*, bacterias del género *Agrobacterium*, bacterias del género *Rhizobium*, bacterias del género *Staphylococcus*, bacterias del género *Bifidobacterium*, y bacterias del género *Escherichia*. Un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una cepa de *Escherichia coli* O157. Un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una cepa de *Escherichia coli* O157 es particularmente preferible. Es preferible que una secuencia señal para transferir cscA al periplasma de la célula bacteriana se haya añadido a cscA.

Como un gen de la proteína represora (CscR), se puede usar un ADN que tiene la secuencia base de un gen que codifica una proteína represora (CscR) obtenida de un organismo que posee la enzima, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza basándose en una secuencia base conocida del gen. Los ejemplos preferibles incluyen los procedentes de bacterias del género *Erwinia*, bacterias del género *Proteus*, bacterias del género *Vibrio*, bacterias del género *Agrobacterium*, bacterias del género *Rhizobium*, bacterias del género *Staphylococcus*, bacterias del género

*Bifidobacterium*, y bacterias del género *Escherichia*. Un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una cepa de *Escherichia coli* O157. El ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una cepa de *Escherichia coli* O157 es particularmente preferible.

5 Como un gen de la fructoquinasa (CscK), se puede usar un ADN que tiene la secuencia base de un gen que codifica una fructoquinasa (CscK) obtenida de un organismo que posee la enzima, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos preferibles incluyen los procedentes de bacterias del género *Erwinia*, bacterias del género *Proteus*, bacterias del género *Vibrio*, bacterias del género *Agrobacterium*, bacterias del género *Rhizobium*, bacterias del género *Staphylococcus*, bacterias del género *Bifidobacterium*, y bacterias del género *Escherichia*. Un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una cepa de *Escherichia coli* O157. El ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una cepa de *Escherichia coli* O157 es particularmente preferible.

15 Como un gen de la sacarosa permeasa (CscB), se puede usar un ADN que tiene la secuencia base de un gen que codifica una sacarosa permeasa (CscB) obtenida de un organismo que posee la enzima, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza basándose en una secuencia base conocida de el gen. Los ejemplos preferibles incluyen los procedentes de bacterias del género *Erwinia*, bacterias del género *Proteus*, bacterias del género *Vibrio*, bacterias del género *Agrobacterium*, bacterias del género *Rhizobium*, bacterias del género *Staphylococcus*, bacterias del género *Bifidobacterium*, y bacterias del género *Escherichia*. Un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una cepa de *Escherichia coli* O157. El ADN que tiene la secuencia de bases de un gen procedente de una cepa de *Escherichia coli* O157 es particularmente preferible.

25 En la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención, la actividad de una enzima del sistema de producción de alcohol isopropílico, preferiblemente la actividad de al menos una de alcohol isopropílico deshidrogenasa o acetoacetato deshidrogenasa entre las enzimas del sistema de producción de alcohol isopropílico, puede derivarse de un gen introducido como un gen modificado.

30 Como se usa en la invención, la frase "gen modificado" abarca cualquier producto obtenido tras someter la secuencia de bases del gen de la enzima a modificación, tal como delección, sustitución o adición. Específicamente, sus ejemplos incluyen un producto en el que la modificación se realiza solo en codones de la secuencia de bases del gen de la enzima y en el que la secuencia de aminoácidos sintetizada basada en la secuencia de bases modificada solo para codones no cambia, y un producto en el que la modificación se hace solo para la región promotora de un gen de una enzima y en el que la secuencia de aminoácidos sintetizada basada en la secuencia de bases modificada solo en la región promotora no cambia.

35 El gen de la enzima a modificar puede ser un gen innato del hospedador o un gen de la enzima procedente de un microorganismo de una especie diferente.

40 Además, solo un gen de la enzima que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa o solo un gen de la enzima acetoacetato deshidrogenasa puede modificarse genéticamente, o ambos genes pueden modificarse genéticamente al mismo tiempo.

45 El gen modificado puede tener cualquier modificación siempre que la modificación génica de cualquiera de los genes de la enzima descritos anteriormente tenga como resultado un aumento de la capacidad para producir una sustancia diana mediante la provisión de la actividad enzimática de una enzima correspondiente a un hospedador o mediante el aumento de la actividad enzimática.

50 El gen modificado es preferiblemente un gen modificado cuyos codones empleados se han modificado de acuerdo con la frecuencia del uso de los codones en *Escherichia coli*. Tal gen modificado permite un aumento de la eficacia de la producción de alcohol isopropílico.

55 Como se usa en la invención, la frase "modificar los codones empleados" significa la modificación de codones, que son secuencias de tripletes de bases correspondientes a los aminoácidos respectivos, en la secuencia de bases que codifica y define una secuencia de aminoácidos. Tal como se usa en la invención, la expresión "modificación de codón" significa la modificación solo de la secuencia de bases sin alteración de la secuencia de aminoácidos.

60 El gen modificado de la alcohol isopropílico deshidrogenasa preferiblemente tiene una secuencia de bases representada por la SEQ ID NO: 40. El gen modificado de la acetoacetato deshidrogenasa preferiblemente tiene una secuencia de bases representada por la SEQ ID NO: 43. La actividad de cada una de la alcohol isopropílico deshidrogenasa y la acetoacetato deshidrogenasa preferiblemente puede aumentarse usando los genes modificados.

65 En la presente invención, *Escherichia coli* significa *Escherichia coli* que se puede producir para que tenga la capacidad de producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de una planta mediante el uso de ciertos medios, independientemente de si la *Escherichia coli* originalmente tiene la capacidad de producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas.

Aquí la *Escherichia coli* que se someterá a recombinación genética es *Escherichia coli* que no tiene capacidad de producción de alcohol isopropílico, y puede ser cualquier *Escherichia coli* que permite la introducción o modificación de los genes respectivos.

- 5 La *Escherichia coli* es *Escherichia coli* a la cual se le ha conferido la capacidad de producción de alcohol isopropílico por adelantado. Al usar tal *Escherichia coli*, el alcohol isopropílico se puede producir de manera más eficiente.

10 La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico es un *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico a la que se le ha conferido impartido la actividad acetoacetato descarboxilasa, la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, la actividad CoA transferasa y la tiolasa para poder producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas, y que se describe, por ejemplo, en el documento WO 2009/008377.

15 Un método para producir alcohol isopropílico de acuerdo con la invención incluye producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas usando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico descrita anteriormente, e incluye específicamente cultivar la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en un estado en el que la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico se pone en contacto con una materia prima procedente de plantas (en lo sucesivo, proceso de cultivo), y recoger el alcohol isopropílico obtenido por el contacto (en lo sucesivo, proceso de recogida).

20 La materia prima procedente de plantas que se utilizará en el método de producción de alcohol isopropílico es una fuente de carbono obtenida de una planta, y no está restringida siempre que sea una materia prima procedente de plantas. En la invención, la materia prima procedente de plantas se refiere a órganos tales como raíces, cañas, tallos, ramas, hojas, flores y semillas, cuerpos de las plantas incluyendo los órganos de la planta y productos de descomposición de los órganos de la planta, y además abarca fuentes de carbono que pueden ser utilizadas como  
25 fuentes de carbono por microorganismos durante el cultivo a partir de fuentes de carbono obtenidas de los cuerpos de las plantas, los órganos de las plantas y sus productos de descomposición.

30 Las fuentes de carbono incluidas en tales materias primas procedentes de plantas generalmente incluyen azúcares como almidón, sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa y arabinosa, o productos de descomposición herbácea y leñosa o hidrolizados de celulosa, cada uno de los cuales contiene los ingredientes anteriores en grandes cantidades y combinaciones de los mismos. Las fuentes de carbono de la invención pueden incluir además glicerina y ácidos grasos derivados de aceite vegetal.

35 Los ejemplos preferidos de la materia prima procedente de plantas en la invención incluyen productos agrícolas tales como granos, maíz, arroz, trigo, soja, caña de azúcar, remolacha, algodón y similares, o combinaciones de los mismos. La forma de la misma como materia prima no está específicamente limitada, y puede ser un producto crudo, jugo exprimido, un producto triturado o similar. En otra alternativa, la materia prima procedente de plantas puede estar en una forma que consiste únicamente en la fuente de carbono descrita anteriormente.

40 En el proceso de cultivo, el contacto entre la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico y una materia prima procedente de plantas generalmente se elabora cultivando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en un medio de cultivo que contiene la materia prima procedente de plantas.

45 La densidad de contacto entre la materia prima procedente de plantas y la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico puede variar según la actividad de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico. En general, la concentración de la materia prima procedente de plantas en el medio de cultivo puede ser tal que la concentración inicial de azúcar en términos de glucosa se puede establecer en un 20 % en masa o menos con respecto a la masa total de la mezcla. Desde el punto de vista de la tolerancia al azúcar de *Escherichia coli*, la concentración inicial de azúcar se establece preferiblemente en 15 % en masa o inferior. Se pueden añadir otros componentes en las  
50 cantidades de adición habituales para medios de cultivo de microorganismos, sin limitación particular.

55 El contenido de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en el medio de cultivo puede variar con el tipo y la actividad de la *Escherichia coli*, y la cantidad de un líquido bacteriano precultivo (DO 660 nm = 4 a 8) que se añadirá al comenzar el cultivo generalmente se puede fijar para que sea de 0,1 % en masa a 30 % en masa en relación con el líquido de cultivo, y preferiblemente se fija para que sea del 1 % en masa al 10 % en masa en relación con el líquido de cultivo desde el punto de vista del control de las condiciones de cultivo.

60 El medio de cultivo que se utilizará para el cultivo de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico puede ser cualquier medio de cultivo habitualmente empleado que incluya una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos y oligoelementos orgánicos, ácidos nucleicos, vitaminas, etc. requeridos por los microorganismos para producir ácido láctico, sin limitación particular.

65 Las condiciones de cultivo para el cultivo en la invención no están particularmente restringidas, y el cultivo puede llevarse a cabo, por ejemplo, en condiciones aeróbicas a un pH y temperatura adecuadamente controlados dentro de un intervalo de pH 4 a 9, preferiblemente de pH 6 a 8, y dentro de un intervalo de 20 °C a 50 °C, preferiblemente de 25 °C a 42 °C.

El volumen de aireación del gas en la mezcla descrita anteriormente no está particularmente restringido. Cuando solo se usa aire como gas, el volumen de aireación es generalmente de 0,02 vvm a 2,0 vvm (vvm; volumen de aireación [ml]/volumen líquido [ml]/tiempo [min]), y, desde el punto de vista de la evitación de daños físicos a *Escherichia coli*, la aireación se lleva a cabo preferiblemente a 0,1 vvm a 1,5 vvm.

El proceso de cultivo puede ser continuo desde el comienzo del cultivo hasta que la materia prima procedente de plantas en la mezcla se agote, o hasta que la actividad de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico desaparece. La duración del proceso de cultivo puede variar con el número y la actividad de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en la mezcla y la cantidad de materia prima procedente de plantas. En general, la duración puede ser de al menos una hora, y preferiblemente de al menos cuatro horas. La duración del cultivo puede continuar ilimitadamente mediante una nueva adición de la materia prima procedente de plantas o la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico. Sin embargo, desde el punto de vista de la eficacia del proceso, la duración generalmente puede fijarse en 5 días o menos, preferiblemente 72 horas o menos. Con respecto a otras condiciones, las condiciones empleadas para el cultivo habitual pueden aplicarse tal cual.

Los métodos para recoger el alcohol isopropílico acumulado en el medio de cultivo no están particularmente restringidos. Por ejemplo, puede emplearse un método que incluye eliminar células bacterianas del líquido de cultivo mediante, por ejemplo, separación centrífuga, y después separar el alcohol isopropílico usando un método de separación habitual tal como destilación o separación por membrana.

El método de producción de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención puede incluir además un proceso de precultivo antes del proceso de cultivo para producir alcohol isopropílico, con vistas a lograr un número de células apropiado o un estado activado apropiado de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico a ser utilizada. El proceso de precultivo puede ser cualquier cultivo realizado en condiciones de cultivo habitualmente empleadas adecuadas para el tipo de bacteria productora de alcohol isopropílico empleada.

El método para producir alcohol isopropílico de acuerdo con la invención preferiblemente incluye un proceso de cultivo en el cual la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico se cultiva mientras se suministra gas a la mezcla que contiene la bacteria productora de alcohol isopropílico y la materia prima procedente de plantas; y un proceso de recogida en el que el alcohol isopropílico producido por el cultivo se separa y se recoge de la mezcla.

De acuerdo con este método, la *Escherichia coli* productora se cultiva mientras se suministra gas a la mezcla (cultivo de aireación). En este cultivo de aireación, el alcohol isopropílico producido se libera en la mezcla y se evapora de la mezcla. Como resultado, el alcohol isopropílico producido se puede separar fácilmente de la mezcla. Además, dado que el alcohol isopropílico producido se separa continuamente de la mezcla, se puede regular un aumento en la concentración de alcohol isopropílico en la mezcla. Por lo tanto, no es necesario prestar especial atención a la tolerancia al alcohol isopropílico de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico.

La mezcla en este método puede estar compuesta principalmente de un medio básico generalmente utilizado en cultivo de *Escherichia coli*. Con respecto a las condiciones de cultivo, las descritas anteriormente se aplicarán tal como cual.

En el proceso de recogida, se recoge el alcohol isopropílico producido en el proceso de cultivo y se separado de la mezcla. El método de recogida puede ser cualquier método capaz de recoger alcohol isopropílico en estado gaseoso o en gotas evaporado de la mezcla mediante cultivo habitual. Los ejemplos de dicho método incluyen un método de recogida en un elemento de recogida, tal como un recipiente hermético comúnmente empleado. En particular, el método incluye preferiblemente poner en contacto una solución trampa para atrapar alcohol isopropílico con alcohol isopropílico separado de la mezcla, desde el punto de vista de recoger solamente alcohol isopropílico de alta pureza.

En el presente método, el alcohol isopropílico puede recogerse en un estado en el que el alcohol isopropílico se disuelve en una solución trampa o en la mezcla. Los ejemplos de dicho método de intercalación incluyen un método descrito en el documento WO 2009/008377. El alcohol isopropílico recogido se puede confirmar usando un medio de detección habitual tal como HPLC. El alcohol isopropílico recogido puede purificarse adicionalmente, si es necesario. Los ejemplos del método de purificación incluyen destilación, etc.

En el caso en el que el alcohol isopropílico recogido está en el estado de solución acuosa, el presente método de producción de alcohol isopropílico puede incluir además un proceso de deshidratación además del proceso de recogida. La deshidratación del alcohol isopropílico se puede llevar a cabo usando un método ordinario.

Un ejemplo de aparatos aplicables al método de producción de alcohol isopropílico en el que el alcohol isopropílico se puede recoger en el estado de disolución en la solución trampa o la mezcla es el aparato de producción que se muestra en la Fig. 1 del documento WO 2009/008377.

En el aparato de producción, un tubo de inyección para inyectar un gas desde el exterior del aparato está conectado a un tanque de cultivo que contiene un medio de cultivo que incluye una bacteria productora de alcohol isopropílico y una materia prima procedente de plantas, permitiendo así la aireación del medio de cultivo.

Un tanque trampa que contiene una solución trampa donde la solución trampa se conecta al tanque de cultivo a través de un tubo de conexión. Un gas o líquido que se ha movido al tanque trampa entra en contacto con la solución trampa y se produce el burbujeo.

5 Como resultado, el alcohol isopropílico, que se ha producido en el tanque de cultivo por cultivo bajo aireación, se evapora debido a la aireación, y así se separa fácilmente del medio de cultivo, y queda atrapado en la solución trampa en el tanque trampa. Como resultado, el alcohol isopropílico se puede producir en un estado más purificado de una manera simple y continua.

10 El método de producción de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención permite una alta producción de alcohol isopropílico, y la cantidad de producción habitualmente obtenida empleando el método de acuerdo con la invención es mayor que las cantidades de producción habitualmente obtenidas empleando métodos similares a los que no se aplica la invención. Aunque la productividad varía con las condiciones del método de producción y el estado de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que se utiliza, se puede lograr una productividad de 50 a 100  
15 g/l/72 h, preferiblemente de 55 a 80 g/l/72 h.

Como se explicó anteriormente, la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención es capaz de una alta producción de alcohol isopropílico. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden acumular 75 g/l o más de alcohol isopropílico después de cultivar durante 72 horas en el caso de la producción de alcohol isopropílico usando el catalizador de *Escherichia coli* de acuerdo con la invención, por lo que puede obtenerse una productividad mucho mayor que la conseguida por los catalizadores convencionales.

20 En la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención, la acetona, que es un precursor del alcohol isopropílico, se produce al mismo tiempo. La acetona obtenida se convierte preferiblemente en alcohol isopropílico usando un método conocido (por ejemplo, un método descrito en la Publicación de Patente Japonesa N.º 2786272) después de su purificación usando un método conocido. Esto aumenta aún más la eficiencia de conversión del azúcar como materia prima al alcohol isopropílico.

25 El método de producción de acetona de acuerdo con la invención es un método de producción de acetona que incluye:

30 obtener alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico (en lo sucesivo denominado el proceso de producción de alcohol isopropílico);  
y  
35 poner en contacto el alcohol isopropílico obtenido con un óxido complejo como catalizador que incluye óxido de zinc y al menos un óxido que contiene un elemento del Grupo 4, y que se prepara mediante coprecipitación (en lo sucesivo denominado el proceso de producción de acetona).

40 El alcohol isopropílico obtenido usando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico se pone en contacto con el óxido complejo preparado por coprecipitación, mediante la cual se produce una reacción de deshidrogenación y se produce acetona a partir de alcohol isopropílico. De esta manera, el alcohol isopropílico producido usando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico se puede utilizar de manera efectiva para realizar una producción eficiente de sustancias.

45 Con respecto a la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, la materia prima procedente de plantas, las condiciones de producción de alcohol isopropílico, etc. empleadas en el proceso de producción de alcohol isopropílico, se aplicarán tal cual las descritas anteriormente para la producción de alcohol isopropílico.

50 En el proceso de producción de acetona, se usa como catalizador un óxido complejo que incluye óxido de zinc y al menos un óxido que contiene un elemento del Grupo 4, y que se prepara por coprecipitación.

55 Un elemento del Grupo 4 se refiere a un elemento del Grupo 4 de la tabla periódica, y ejemplos de este incluyen titanio, zirconio, hafnio, etc. El zirconio es preferible desde el punto de vista de la producción altamente selectiva de acetona.

Los ejemplos de óxidos complejos que se pueden usar como catalizador incluyen ZnO:ZrO<sub>2</sub>, ZnO:TiO<sub>2</sub>, CuO:ZnO:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, etc. ZnO:ZrO<sub>2</sub> es preferible en términos de actividad catalítica y selectividad de la acetona.

60 La relación entre óxido de zinc y al menos un óxido que contiene un elemento del Grupo 4 no está particularmente restringida, y es preferiblemente de 50:50 a 99:1 desde el punto de vista de la actividad catalítica y selectividad de la acetona, y más preferiblemente de 65:35 a 95:5. Cuando la proporción de óxido de zinc es 50 o más, se puede exhibir una actividad catalítica más alta. Cuando la proporción de óxido de zinc es 99 o menos, se puede exhibir una mayor selectividad de la acetona. Por lo tanto, es preferible una relación dentro del rango anterior.

65 El óxido complejo se prepara por coprecipitación. Dado que el óxido complejo que puede usarse como catalizador se prepara por coprecipitación, el óxido complejo tiene una ventaja tal como la uniformidad de la composición del

catalizador o la facilidad de control sobre la preparación del catalizador.

5 La coprecipitación es un método de preparación comúnmente empleado como método para la producción de un complejo de óxido multicomponente, y la adición de un precipitante como una solución acuosa alcalina a una solución acuosa mixta de dos o más tipos de sales metálicas permite la precipitación uniforme del óxido complejo como un sólido.

10 En un método específico para preparar el catalizador, se mezclan una solución acuosa de una sal de zinc soluble en agua tal como nitrato de zinc y una solución acuosa de una sal de zirconio soluble en agua tal como nitrato de zirconio para obtener una composición de óxido metálico deseada. Esta solución acuosa se añade gota a gota a una solución acuosa alcalina tal como carbonato de sodio para la alcalinización, para precipitar un sólido en forma de un hidróxido. El precipitado generado se filtra, se lava con agua y se seca, y luego se calcina, como resultado de lo cual se produce el catalizador.

15 La cantidad de catalizador utilizada cuando se practica la invención no está particularmente restringida. Por ejemplo, cuando se lleva a cabo una reacción usando un reactor de lecho fijo, el valor obtenido al dividir la cantidad (masa) de la materia prima (alcohol isopropílico) suministrada por hora por la masa del catalizador, - WHSV - está preferiblemente en un intervalo de 0,01 a 200/h, y más preferiblemente en un intervalo de 0,02 a 100/h.

20 La reacción de deshidrogenación en la invención puede llevarse a cabo de una manera de reacción tal como una manera discontinua o una manera continua. En el caso de la manera continua, las materias primas, por ejemplo, fluyen a través de un reactor tubular lleno de un catalizador, y se recogen los productos de reacción que salen del reactor.

25 La temperatura de reacción para llevar a cabo la reacción de deshidrogenación puede ser habitualmente de 100 °C a 500 °C, preferiblemente de 150 °C a 450 °C, y aún más preferiblemente de 200 °C a 400 °C. Hay una relación de equilibrio entre la acetona, el alcohol isopropílico y el hidrógeno. Una temperatura de reacción más alta da como resultado una composición de acetona más alta en equilibrio. Por lo tanto, es preferible una temperatura de reacción de 100 °C o superior, ya que el alcohol isopropílico no permanece en una gran cantidad a dicha temperatura. Es preferible una temperatura de reacción de 500 °C o inferior ya que las reacciones secundarias no deseadas no aumentan a dicha temperatura. La presión de reacción no está particularmente restringida. Aunque la presión de reacción depende de la temperatura de reacción, la presión de reacción se fija preferiblemente entre 0,1 MPa y 1,0 MPa.

35 Después de recoger el producto de reacción, se puede llevar a cabo adicionalmente la purificación, etc., según corresponda, de acuerdo con la necesidad. Con respecto al método de purificación de acetona, etc., pueden aplicarse métodos de purificación conocidos o bien conocidos en la técnica.

40 El método de producción de propileno de acuerdo con la invención incluye:

obtener alcohol isopropílico que contiene acetona a partir de una materia prima procedente de plantas utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico (en lo sucesivo denominado "proceso de producción de alcohol isopropílico"); y  
45 permitir que la acetona y el hidrógeno reaccionen entre sí en presencia de, como catalizadores, un catalizador de hidrogenación que contiene Cu y una sustancia ácida sólida en un intervalo de temperatura de reacción de 50 a 300 °C usando el alcohol isopropílico que contiene acetona obtenido (en lo sucesivo denominado "proceso de reacción catalítica"). En la presente memoria descriptiva, el catalizador de hidrogenación que contiene Cu también se denomina en lo sucesivo simplemente "catalizador de hidrogenación".

50 En el método de producción de propileno, el alcohol isopropílico obtenido por la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico es deshidratado por la sustancia ácida sólida para producir propileno y agua.

Con respecto a la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, la materia prima procedente de plantas, las condiciones de producción de alcohol isopropílico, etc., empleadas en el proceso de producción de alcohol isopropílico, pueden aplicarse tal cual las descritas anteriormente para la producción de alcohol isopropílico.

55 En el proceso de reacción catalítica, la acetona y el hidrógeno se hacen reaccionar en condiciones predeterminadas utilizando el alcohol isopropílico que contiene acetona obtenido en el proceso de producción de alcohol isopropílico como materia prima y usando un catalizador de hidrogenación que contiene Cu y una sustancia ácida sólida.

60 El hidrógeno que se utilizará en el proceso de reacción catalítica puede ser hidrógeno gaseoso molecular, o puede ser hidrógeno procedente de un hidrocarburo, tal como ciclohexano, que genera hidrógeno, dependiendo de las condiciones de reacción. La cantidad de hidrógeno puede ser, en principio, cualquier cantidad que no sea inferior a una cantidad equimolar a acetona. Desde el punto de vista de la separación y la recogida, la cantidad molar de hidrógeno es preferiblemente de 1 a 10 veces la de la acetona, y más preferiblemente de 1 a 5 veces la de la acetona. Por ejemplo, la cantidad de hidrógeno suministrado por unidad de tiempo con relación a la cantidad de

65

acetona suministrada por unidad de tiempo puede ajustarse dentro del rango descrito anteriormente. En un caso en el que se desea una tasa de conversión de acetona del 100 % o inferior, la relación de conversión se puede lograr reduciendo la cantidad de hidrógeno de la cantidad equimolar a la acetona.

5 En el proceso de reacción catalítica, el hidrógeno suministrado se une al átomo de oxígeno de la acetona para formar agua, la cual puede descargarse desde la salida del reactor. Además, el hidrógeno en exceso de la cantidad equimolar a la acetona no se consumirá esencialmente a menos que se produzcan reacciones secundarias inesperadas.

10 El suministro de gas hidrógeno al reactor normalmente se lleva a cabo mediante suministro continuo, pero no está particularmente limitado a ello. Con respecto a la forma de suministro de hidrógeno, el suministro puede ser un suministro intermitente que incluye suministrar gas hidrógeno al inicio de la reacción, detener después el suministro durante la reacción, y reiniciar el suministro después de un cierto período de tiempo. En el caso de una reacción en fase líquida, el gas hidrógeno puede suministrarse disolviéndolo en un disolvente.

15 Además, el hidrógeno puede recuperarse del reactor y reutilizarse. El proceso de reciclado para el hidrógeno puede incluir, por ejemplo, separar la solución de reacción y el gas de reacción entre sí en la parte posterior del reactor usando un separador de gas-líquido; separar el gas hidrógeno del gas de reacción usando una membrana de separación, etc. y volver a suministrar el gas hidrógeno a la entrada del reactor. En el caso de este proceso de reciclado, el gas hidrógeno recogido de la cabeza junto con la fracción de bajo punto de ebullición puede suministrarse al reactor. La presión de hidrógeno a suministrar es generalmente igual a la presión del reactor, pero puede cambiarse, según sea apropiado, de acuerdo con el método de suministro de hidrógeno.

20 Cuando se pone en práctica la invención, la reacción se puede llevar a cabo en un estado diluido obtenido suministrando un disolvente o gas que es inerte a catalizadores y materiales de partida (acetona, alcohol isopropílico e hidrógeno) al sistema de reacción.

25 La temperatura de reacción aplicada en el proceso de reacción catalítica es de 50 °C a 300 °C. Con una temperatura de reacción por debajo de 50 °C, no se obtiene una relación de conversión suficiente entre acetona o alcohol isopropílico. Con una temperatura de reacción superior a 300 °C, se producen reacciones secundarias inesperadas, polimerización de propileno, etc. como resultado de lo cual no se puede mantener una relación de selección suficiente para el propileno. Desde el punto de vista de la eficiencia económica, la temperatura de reacción está preferiblemente en un intervalo de 150 °C a 250 °C, y más preferiblemente en un intervalo de 150 a 200 °C.

30 En un caso en el que se lleva a cabo la reacción, otros métodos y condiciones no están particularmente restringidos, y, por ejemplo, se pueden emplear las condiciones y métodos mencionados a continuación. El contacto de la acetona y el alcohol isopropílico, que son materiales de partida, con el hidrógeno, y el método de suministro de hidrógeno, puede ser cualquiera de flujo en contracorriente gas-líquido o flujo en paralelo gas-líquido. Las direcciones de flujo de líquido y gas pueden ser cualquiera de: líquido descendente - gas ascendente; líquido ascendente - gas descendente; líquido ascendente - gas ascendente; y líquido descendente - gas descendente. Además, la presión aplicada es preferiblemente de 0,1 atm a 500 atm y más preferiblemente de 0,5 atm a 100 atm.

35 Los ejemplos de la sustancia ácida sólida incluyen óxidos metálicos tales como zeolita, sílice, alúmina, sílice alúmina,  $\gamma$ -alúmina, óxido de titanio, óxido de zinc y óxido de zirconio, que son ácidos sólidos ordinarios. Entre estos, la zeolita es preferible desde el punto de vista de la alta actividad catalítica y la alta selectividad para el propileno.

40 Una zeolita que es favorable en vista de los tamaños moleculares del alcohol isopropílico, que se cree que está presente como materia prima y un intermedio en la reacción descrita anteriormente, y el propileno, que es la sustancia diana, se puede elegir como la zeolita para ser usada.

45 Las zeolitas que tienen poros de 10 anillos a 12 anillos son preferibles porque sus tamaños moleculares son similares a los tamaños moleculares del alcohol isopropílico y el propileno. Los ejemplos de zeolitas que tienen poros de 10 anillos a 12 anillos incluyen ferrierita, heulandita, ZSM-5, ZSM-11, ZSM-12, NU-87, theta-1, weinebeneita, zeolita-X, zeolita-Y, zeolita USY, mordenita, mordenita desaluminada,  $\beta$ -zeolita, MCM-22, MCM-56, etc. De estas, es preferible la  $\beta$ -zeolita.

50 La relación de composición de silicio a aluminio (silicio/aluminio) en la zeolita está preferiblemente en un intervalo de 2/1 a 200/1 con el fin de obtener una alta actividad, y particularmente preferiblemente en un intervalo de 5/1 a 100/1 desde los puntos de vista de la actividad y la estabilidad térmica. Además, se puede utilizar una denominada zeolita sustituida isomorfa en la que el aluminio contenido en el marco de zeolita se reemplaza por un metal distinto del aluminio, como Ga, Ti, Fe, Mn o B. La zeolita que se utilizará también puede ser una zeolita modificada con iones metálicos.

55 La forma de la sustancia ácida sólida no está particularmente restringida, y puede ser cualquiera de las formas esféricas, cilíndricas, extruidas y trituradas. El tamaño de partícula de la misma tampoco está particularmente restringido, y la sustancia ácida sólida puede seleccionarse entre aquellas que tienen tamaños en un intervalo de

0,01 mm a 100 mm, de acuerdo con el tamaño del reactor. Una sustancia ácida sólida se puede usar por separado, o se pueden usar dos o más sustancias ácidas sólidas.

5 Los ejemplos del catalizador de hidrogenación que contiene Cu incluyen aquellos que contienen Cu metálico, y los que contienen Cu en forma de compuestos metálicos, etc. Ejemplos de los compuestos metálicos incluyen óxido de metal tal como CuO y Cu<sub>2</sub>O, cloruros metálicos como CuCl<sub>2</sub>, etc. El catalizador puede retenerse en un soporte.

10 Es preferible que el catalizador de hidrogenación que contiene Cu incluya además al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en elementos del Grupo 6, Grupo 12 y Grupo 13 en la tabla periódica desde el punto de vista de obtener mayor selectividad o mayor vida del catalizador. Los elementos preferidos del Grupo 6 incluyen Cr, Mo, etc., los elementos preferidos del Grupo 12 incluyen Zn, etc., y los elementos preferidos del Grupo 13 incluyen Al, In, etc. Ejemplos de tal catalizador de hidrogenación incluyen un catalizador a base de cobre tal como cobre-cromo, cobre Raney y cobre-zinc.

15 Al catalizador de hidrogenación que contiene Cu se puede añadir una sal de metal como PbSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>2</sub> o SnCl<sub>2</sub>, un metal alcalino como K o Na o una sal de metal alcalino, BaSO<sub>4</sub>, o similares. Hay casos en los que la adición mejora la actividad del catalizador de hidrogenación que contiene Cu y la relación de selección para el propileno. La cantidad de sal metálica, metal alcalino o sal de metal alcalino a añadir al catalizador de hidrogenación no está particularmente restringida, y es preferiblemente de 0,01 % en masa a 10,00 % en masa, principalmente desde el  
20 punto de vista de la selectividad.

Ejemplos de catalizadores de hidrogenación que contienen Cu comercializados incluyen CuO-ZnO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO-Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-BaO, etc.

25 La forma del catalizador de hidrogenación no está particularmente restringida, y puede ser cualquiera de las formas esféricas, cilíndricas, extruidas y trituradas. El tamaño de partícula del mismo tampoco está particularmente restringido, y el catalizador de hidrogenación se puede elegir habitualmente entre aquellos que tienen tamaños en un intervalo de 0,01 mm a 100 mm de acuerdo con el tamaño del reactor.

30 En el método de producción de propileno de acuerdo con la invención, la acetona y el hidrógeno pueden suministrarse a un reactor lleno con el catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida, y la acetona y el hidrógeno pueden reaccionar entre sí. La cantidad total del catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida cargada en el reactor (en lo sucesivo también denominada "cantidad de catalizador") no está particularmente restringida. Por ejemplo, en un caso en el que la reacción se lleva a cabo utilizando un dispositivo de flujo de lecho fijo equipado con un reactor de lecho fijo, el valor obtenido al dividir la cantidad (masa) de acetona (material de  
35 partida) suministrada por unidad de tiempo por la cantidad de catalizador (peso), que es WHSV, está preferiblemente en un intervalo de 0,1 a 200/h, y más preferiblemente en un intervalo de 0,2 a 100/h.

40 La relación cuantitativa entre la sustancia ácida sólida y el catalizador de hidrogenación no está particularmente restringida, y es preferible que la relación, sustancia ácida sólida:catalizador de hidrogenación (relación másica), sea habitualmente de 1:0,01 a 1:100, y preferiblemente de 1:0,05 a 1:50. Existe una tendencia a que una relación cuantitativa de sustancia ácida sólida:catalizador de hidrogenación de 1:(0,01 o más) proporcione una relación de conversión de acetona suficiente. También hay una tendencia a que una relación cuantitativa de sustancia ácida sólida:catalizador de hidrogenación de 1:(100 o menos) permita que la reacción de deshidratación proceda  
45 adecuadamente para proporcionar un rendimiento de propileno suficiente.

50 En un caso en el que la actividad de los catalizadores disminuye después de que la reacción se continúa durante un cierto período de tiempo, la regeneración puede llevarse a cabo usando métodos conocidos, recuperando de este modo la actividad del catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida.

55 En la invención, los dos componentes, la sustancia ácida sólida y el catalizador de hidrogenación, pueden usarse como catalizadores. Los modos de uso de los catalizadores no están particularmente restringidos. Por ejemplo, la sustancia ácida sólida, que es un componente de catalizador ácido, y el catalizador de hidrogenación pueden mezclarse físicamente en el nivel de partículas de catalizador de un tamaño de un centímetro, o la sustancia ácida sólida y el catalizador de hidrogenación pueden estar finamente divididos, mezclados y a continuación se vuelve a formar en partículas de catalizador de un tamaño de un centímetro, o el catalizador de hidrogenación puede retenerse en la sustancia ácida sólida que sirve como vehículo, o la sustancia ácida sólida puede retenerse en el catalizador de hidrogenación que sirve como un vehículo. En otra alternativa, el catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida se pueden usar individualmente sin estar, por ejemplo, mezclados entre sí.  
60

65 En particular, desde el punto de vista de la alta actividad, alta selectividad y disponibilidad industrial, es preferible usar el catalizador de hidrogenación y usar  $\beta$ -zeolita como zeolita para constituir la sustancia ácida sólida. Por ejemplo, el catalizador de hidrogenación se puede retener en zeolita. Los ejemplos de métodos de preparación para los mismos incluyen: un método que incluye impregnar zeolita con una solución acuosa de una sal de nitrato de Cu y calcinar el resultante; un método que incluye añadir un complejo en el cual las moléculas orgánicas llamadas ligando se unen al Cu con el fin de proporcionar al Cu una solubilidad en un disolvente orgánico, a un solvente orgánico para

preparar una solución, impregnar la zeolita con la solución y calcinar el resultante; un método que incluye permitir que el complejo se retenga sobre la zeolita mediante, por ejemplo, deposición de vapor, considerando el hecho de que algunos complejos se pueden vaporizar al vacío; etc.

5 El catalizador de hidrogenación se puede retener en un vehículo distinto de la zeolita. Ejemplos de vehículos capaces de retener el catalizador de hidrogenación incluyen sílice, alúmina, sílice-alúmina, titanía, magnesia, sílice-magnesia, zirconia, óxido de zinc, carbono (carbón activado), arcilla ácida, tierra de diatomeas, etc. De estos, es preferible seleccionar al menos uno seleccionado del grupo que consiste en sílice, alúmina, sílice-alúmina, titanía, magnesia, sílice-magnesia, zirconia, óxido de zinc y carbono (carbón activado), desde el punto de vista de una mayor actividad y una mayor selectividad,

Los ejemplos del reactor usado en la invención incluyen un reactor de lecho fijo, un reactor de lecho fluidizado, etc. El reactor de lecho fijo es preferible desde el punto de vista de evitar el desgaste y la desintegración de los catalizadores.

15 En la invención, los métodos para añadir el catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida al reactor no están particularmente restringidos. Cuando se usa un reactor de lecho fijo como reactor, el método para añadir el catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida puede afectar significativamente al rendimiento de la reacción. Como se describió anteriormente, se supone que la hidrogenación y una reacción de deshidratación ocurren gradualmente en la invención. Por lo tanto, un método que incluye la adición secuencial de especies de catalizador apropiadas para las etapas respectivas de la reacción en el reactor es un método de llenado preferible, en términos de uso eficiente de los catalizadores y eliminación de reacciones secundarias no deseadas.

25 Es un comportamiento frecuentemente observado en reacciones químicas generales que se produzcan reacciones secundarias inesperadas no observadas a baja presión de hidrógeno o a baja temperatura de reacción, particularmente en el caso de aumentar la presión de hidrógeno o la temperatura de reacción para aumentar la velocidad de reacción. En tal caso, el método para llenar los catalizadores, en particular, tiene la posibilidad de afectar significativamente al rendimiento de la reacción.

30 Por consiguiente, las especies de catalizador apropiadas para las etapas respectivas de la reacción se pueden añadir secuencialmente al reactor, o el catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida se pueden añadir al reactor de manera que la relación de mezcla del catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida formen un gradiente. Los ejemplos de métodos para añadir el catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida al reactor incluyen (1) un método en el que el catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida se mezclan y añaden al reactor; (2) un método en el que la adición al reactor se lleva a cabo para formar una capa formada por el catalizador de hidrogenación (en el lado aguas arriba, es decir, el lado de entrada) y una capa formada por la sustancia ácida sólida (en el lado aguas abajo, es decir, el lado de salida); (3) un método en el que se añade al reactor una sustancia ácida sólida sobre la que se retiene el catalizador de hidrogenación; (4) un método en el que la adición al reactor se lleva a cabo para formar una capa formada por el catalizador de hidrogenación (en el lado aguas arriba, es decir, el lado de entrada) y una capa formada por la sustancia ácida sólida y el catalizador de hidrogenación (en el lado aguas abajo, es decir, el lado de salida); (5) un método en el que la adición al reactor se lleva a cabo para formar una capa formada por el catalizador de hidrogenación (en el lado aguas arriba, es decir, el lado de entrada) y una capa formada por una sustancia ácida sólida sobre la que el catalizador de hidrogenación se retiene (en el lado de aguas abajo, es decir, el lado de salida); (6) un método en el que la adición al reactor se lleva a cabo para formar una capa formada por el catalizador de hidrogenación y la sustancia ácida sólida (en el lado aguas arriba, es decir, el lado de entrada) y una capa formada por la sustancia ácida sólida (en el lado aguas abajo, es decir, el lado de salida); y (7) un método en el que la adición al reactor se lleva a cabo para formar una capa formada por una sustancia ácida sólida sobre la que se retiene el catalizador de hidrogenación (en el lado aguas arriba, es decir, el lado de entrada) y una capa formada por la sustancia ácida sólida (en el lado aguas abajo, es decir, el lado de salida). El lado de aguas arriba se refiere al lado de entrada del reactor, es decir, una capa a través de la cual pasan los materiales de partida en la etapa anterior de la reacción, y el lado de aguas abajo se refiere al lado de salida del reactor, es decir, una capa a través de la cual los materiales de partida, los intermedios y los productos de reacción pasan en la última etapa de la reacción. Los materiales de partida son acetona e hidrógeno. En un caso en el que la acetona y el hidrógeno se suministran al reactor por flujo en contracorriente gas-líquido, el lado aguas arriba (lado de entrada) significa una capa a través de la cual la acetona pasa en la etapa anterior de la reacción.

60 Para mantener la cantidad de producción de propileno, se puede adoptar un método de tiovivo en el que dos o tres reactores se disponen en paralelo y, mientras se lleva a cabo la regeneración de los catalizadores en uno de los reactores, se lleva a cabo la reacción en el uno o dos reactores restantes. Además, en un caso en el que hay tres reactores, se puede usar un método en el que los dos reactores restantes están conectados en serie, reduciendo así la variación en la cantidad de producción. En un caso en el que la invención se lleva a cabo utilizando un sistema de reacción de flujo de lecho fluidizado o un sistema de reacción de lecho móvil, se puede mantener una actividad constante mediante la eliminación continua o intermitente de una parte o la totalidad de los catalizadores y la reposición de una cantidad equivalente de los catalizadores.

65

## Ejemplos

Los ejemplos de la invención se describen a continuación. Sin embargo, la invención no está de ninguna manera limitada a estos ejemplos. Como se usa en la presente memoria, “%” se basa en la masa a menos que se especifique lo contrario.

(Preparación de la variante productora de alcohol isopropílico)

La lista de variantes de *Escherichia coli* y los plásmidos usados en los presentes ejemplos se muestran en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

Tabla 1

Plásmido	Característica	Origen de la descripción referenciada
pBRgapP	pBR322, promotor que contiene GADPH	Ejemplo 2
pla	pBRgapP-IPAdh-adc	Ejemplo 2
plaz	pBRgapP-IPAdh-adc-zwf	Ejemplo 2
plaaa	pBRgapP-IPAdh-adc-atoB-atoD-atoA	Ejemplo 4
pTH18cs1	pBR322, promotor que contiene GADPH	GenBank AB019610

Tabla 2

<i>Escherichia coli</i>	Característica	Origen de la descripción referenciada
B	tipo silvestre	ATCC11303
MG1655	tipo silvestre	ATCC
B::atoDAB	cepa B, el promotor para atoDAB se ha sustituido por el promotor GADPH	Ejemplo 1
BΔpgi	cepa B, Δpgi	Ejemplo 3
B::atoDABΔpgi	cepa B, el promotor para atoDAB se ha sustituido por el promotor GADPH, Δpgi	Ejemplo 5
B::atoDABΔgntR	cepa B, el promotor para atoDAB se ha sustituido por el promotor GADPH, ΔgntR	Ejemplo 6
B::atoDABΔpgiΔgntR	cepa B, el promotor para atoDAB se ha sustituido por el promotor GADPH, Δpgi, ΔgntR	Ejemplo 9
B::atoDABΔgnd	cepa B, el promotor para atoDAB se ha sustituido por el promotor GADPH, Δgnd	Ejemplo 12
B::atoDABΔpgiΔgnd	cepa B, el promotor para atoDAB se ha sustituido por el promotor GADPH, Δpgi, Δgnd	Ejemplo 15
B::atoDABΔgndΔgntR	cepa B, el promotor para atoDAB se ha sustituido por el promotor GADPH, Δgnd, ΔgntR	Ejemplo 18
B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR	cepa B, el promotor para atoDAB se ha sustituido por el promotor GADPH, Δpgi, Δgnd, ΔgntR	Ejemplo 21

### [Ejemplo 1]

<Preparación de la variante B::atoDAB>

Se conoce la secuencia de bases completa del ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 (número de acceso de GenBank U00096) y también se ha descrito la secuencia de bases de un gen que codifica la subunidad α de la CoA transferasa (en lo sucesivo abreviada a veces como “atoD”) de la cepa de *Escherichia coli* MG1655. Es decir, atoD está descrita en 2321469 a 2322131 de la secuencia genómica de la cepa de *Escherichia coli* MG1655, que se describe en el número de acceso GenBank U00096.

La secuencia promotora de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (en lo sucesivo denominada a veces “GAPDH”) de *Escherichia coli*, que está descrita en 397 a 440 en la información de la secuencia de bases con un número de acceso de GenBank X02662, puede usarse como la secuencia de bases de un promotor necesario para expresar el gen mencionado anteriormente. Con el fin de obtener el promotor GAPDH, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde y utilizando cgctcaattgcaatgattgacacgattccg (SEQ ID NO: 1) y acagaattcgctattgtagtgaataaaagg (SEQ ID NO: 2), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción MfeI y EcoRI, obteniendo de este modo un fragmento de ADN de aproximadamente 100 pb que codifica el promotor GAPDH. Se mezcló el fragmento de ADN obtenido y un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pUC19 (número de acceso de GenBank X02514) con una enzima de restricción EcoRI seguido de tratamiento con fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, se transformaron las células competentes de la cepa DH5α de *Escherichia coli* (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) con el producto de ligación y se obtuvieron los transformantes que crecieron en una

placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Diez de las colonias obtenidas se cultivaron individualmente a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina, y se recuperaron los plásmidos, y se seleccionaron los plásmidos en los que se cortó el promotor GAPDH cuando se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI. Además, se verificó la secuencia de ADN de la misma, y un plásmido en el que el promotor GAPDH se insertó apropiadamente se denominó pUCgapP. El pUCgapP obtenido se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI.

Además, para obtener atoD, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR utilizando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando cgaattcgctggtggaacatatgaaaacaaattgatgacattacaagac (SEQ ID NO: 3) y gcggtacctattgtctctctgtgaaacg (SEQ ID NO: 4), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI, obteniendo de este modo un fragmento atoD de aproximadamente 690 pb. Este fragmento de ADN se mezcló con pUCgapP que se había digerido previamente con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI. Los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, se transformaron células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5α (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que atoD se había insertado adecuadamente. El plásmido obtenido se denominó pGAPatoD.

Aquí, la cepa de *Escherichia coli* MG1655 está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection).

Como se describió anteriormente, también se ha descrito la secuencia de bases de atoD en el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655. La PCR se llevó a cabo utilizando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando gctctagatgctgaaatccactagtctgtc (SEQ ID NO: 5) y tactgcagcgttccagcacctatcaacc (SEQ ID NO: 6), las cuales se prepararon basándose en la información génica de la región flanqueante 5' de atoD de la cepa de *Escherichia coli* MG1655, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,1 kpb.

Además, la PCR se llevó a cabo utilizando el vector de expresión pGAPatoD preparado anteriormente como molde y usando ggtctagagcaatgattgacagattccg (SEQ ID NO: 7) preparada basándose en la información de secuencia del promotor GAPDH de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 y un cebador de SEQ ID NO: 4 preparado basándose en la información de secuencia de atoD de la cepa de *Escherichia coli* MG1655, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 790 pb que tiene el promotor GAPDH y atoD.

Los fragmentos obtenidos de los anteriores se digirieron con las enzimas de restricción PstI y XbaI, y XbaI y KpnI, respectivamente, y los fragmentos resultantes se mezclaron con un fragmento obtenido por digestión de un plásmido pTH18cs1 sensible a la temperatura (número de acceso de GenBank AB019610) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)] con PstI y KpnI, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, se transformó la cepa DH5α con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se recuperó un plásmido a partir de las células bacterianas obtenidas. La cepa de *Escherichia coli* B (ATCC11303) se transformó con el plásmido y se cultivó a 30 °C durante la noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron los transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante la noche. Las células bacterianas cultivadas obtenidas se aplicaron a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se cultivaron a 42 °C, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 2 horas en un medio líquido LB exento de antibióticos, y se aplicaron a una placa de agar LB exenta de antibióticos, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una creció individualmente en una placa de agar LB exenta de antibióticos y se seleccionó una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles al cloranfenicol. Además, se amplificó un fragmento de aproximadamente 790 pb que contenía el promotor GAPDH y atoD, por PCR, a partir del ADN cromosómico de estos clones, y se seleccionó una variante en la que se reemplazó una región promotora atoD por el promotor GAPDH. Así, un clon que satisface las condiciones anteriores se llamó *Escherichia coli* B::atoDAB.

Aquí, la cepa de *Escherichia coli* B (ATCC11303) está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection), que es un banco de células, microorganismos y genes.

## [Ejemplo 2]

<Preparación del plásmido plaz>

La acetoacetato descarboxilasa de bacterias del género *Clostridium* se describe en el número de acceso GenBank M55392, y la alcohol isopropílico deshidrogenasa del género *Clostridium* se describe en el número de acceso de

GenBank AF157307.

La secuencia promotora de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (en lo sucesivo algunas veces denominada "GAPDH") de *Escherichia coli*, que se describe en 397 a 440 en la información de la secuencia de bases con un número de acceso de GenBank X02662, se puede usar como la secuencia de bases de un promotor necesario para expresar el grupo de genes mencionado anteriormente.

Con el fin de obtener el promotor GAPDH, la amplificación por un método de PCR se llevó a cabo usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando cgagctacatgcaatgattgacacgattccg (SEQ ID NO: 18) y cgcgcatgctattgttagtgaataaaagg (SEQ ID NO: 19), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción NdeI y SphI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 110 pb correspondiente al promotor GAPDH. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pBR322 (número de acceso de GenBank J01749) con las enzimas de restricción NdeI y SphI, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina y el plásmido pBRgapP se recuperó de las células bacterianas obtenidas.

Con el fin de obtener el gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 como molde y usando aatgcatgctggtggaacatgaaaggtttgcattgctagg (SEQ ID NO: 8) y gcggatcctataataactactgcttaattaagtc (SEQ ID NO: 9), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción SphI y BamHI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de alcohol isopropílico deshidrogenasa de aproximadamente 1,1 kpb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pBRgapP con las enzimas de restricción SphI y BamHI, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37°C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, y se recuperaron plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que IPAdh se había insertado adecuadamente. El plásmido obtenido se denominó pGAP-IPAdh.

Con el fin de obtener el gen de la acetoacetato descarboxilasa, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 como molde y usando caggatccgctggtggaacatgtaaaaggatgaagtaataaacaattagc (SEQ ID NO: 10) y ggaattcggtaccttaagataatcatatataactcagc (SEQ ID NO: 11), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de acetoacetato descarboxilasa de aproximadamente 700 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pGAP-IPAdh preparado anteriormente con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, y se recuperaron plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que adc se había insertado correctamente. El plásmido obtenido se denominó pla.

Con el fin de obtener el gen de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (zwf), se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR utilizando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* B (número de acceso GenBank CP000819) como molde y usando caggatcccggagaaagtcttatggcgtaacgcaaacagcccagg (SEQ ID NO: 12) y cgtctagattactcaaactcattccaggaacgac (SEQ ID NO: 13), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción BamHI y XbaI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa de aproximadamente 1500 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pla preparado anteriormente con las enzimas de restricción BamHI y XbaI, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, y este plásmido se denominó plaz.

Las células competentes de *Escherichia coli* B::atoDAB preparadas en el Ejemplo 1 se transformaron con el plásmido plaz, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo *Escherichia coli* plaz/B::atoDAB.

### [Ejemplo 3]

<Preparación de la variante  $\Delta$ pgi de la cepa de *Escherichia coli* B>

Se conoce toda la secuencia de bases del ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 (número de acceso GenBank U00096), y también está descrita la secuencia de bases de un gen que codifica la fosfoglucosa isomerasa (en lo sucesivo denominada a veces "pgi") de *Escherichia coli* (número de acceso de GenBank X15196). Con el fin de clonar una región que flanquea la secuencia de bases del gen que codifica pgi (1.650 pb), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores oligonucleotídicos representados por caggaattcgctatatctggctctgcacg (SEQ ID NO: 14), cagtctagagcaataactcttctgatttgag (SEQ ID NO: 15), cagtctagatcatcgctgatgtaggcc (SEQ ID NO: 16) y gacctgcagatcatccgtcagctgtacgc (SEQ ID NO: 17). El cebador de SEQ ID NO: 14 tiene un sitio de reconocimiento EcoRI en el lado 5' terminal del mismo, cada uno de los cebadores de SEQ ID NOs: 15 y 16 tiene un sitio de reconocimiento XbaI en el lado 5' terminal del mismo, y el cebador de SEQ ID NO: 17 tiene un sitio de reconocimiento PstI en el lado 5'-terminal del mismo.

Se preparó el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 (ATCC700926) y se llevó a cabo la PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y usando un par de cebadores de SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (en lo sucesivo denominado en ocasiones "fragmento pgi-L"). Además, la PCR también se llevó a cabo usando un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (en lo sucesivo denominado en ocasiones "fragmento pgi-R"). Estos fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en agarosa y se recogieron. El fragmento pgi-L se digirió con EcoRI y XbaI, y el fragmento pgi-R se digirió con XbaI y PstI. Los dos tipos de fragmentos digeridos y un fragmento obtenido digiriendo un plásmido pTH18cs1 sensible a la temperatura (número de acceso de GenBank AB019610) con EcoRI y PstI se mezclaron y se dejaron reaccionar usando ADN ligasa de T4. A continuación, las células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (fabricado por Toyobo Co., Ltd.) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10  $\mu$ g/ml de cloranfenicol a 30 °C. Los plásmidos se recuperaron de los transformantes obtenidos y se confirmó que los dos fragmentos, un fragmento de región flanqueante en dirección 5' y un fragmento de región flanqueante en dirección 3' del gen que codifica pgi, se habían insertado adecuadamente en pTH18cs1. El plásmido obtenido se digirió con XbaI, y luego se sometió a tratamiento de generación de extremos romos con ADN polimerasa de T4. El fragmento de ADN resultante se mezcló con un fragmento de ADN obtenido digiriendo el plásmido pUC4K (número de acceso de GenBank X06404) (Farmacia) con EcoRI y sometiendo adicionalmente el gen resistente a la kanamicina al tratamiento de generación de extremos romos con una ADN polimerasa de T4, y los fragmentos mezclados se ligaron usando ADN ligasa de T4. Posteriormente, células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10  $\mu$ g/ml de cloranfenicol y 50  $\mu$ g/ml de kanamicina a 30 °C. Los plásmidos se recuperaron de los transformantes obtenidos, y se confirmó que el gen resistente a kanamicina se había insertado adecuadamente entre el fragmento de la región flanqueante en dirección 5' y el fragmento de la región flanqueante en dirección 3' del gen que codifica pgi. El plásmido obtenido se denominó pTH18cs1-pgi.

La cepa de *Escherichia coli* B (ATCC11303) se transformó con el plásmido pTH18cs1-pgi así obtenido, y se cultivó a 30 °C durante la noche en una placa de agar LB que contenía 10  $\mu$ g/ml de cloranfenicol y 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, y se cultivaron a 30 °C durante la noche. A continuación, se aplicó parte de este líquido de cultivo a una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, y se aplicaron a una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una creció individualmente en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de kanamicina y una placa de agar LB que contenía 10  $\mu$ g/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron los clones sensibles al cloranfenicol que crecieron solo en la placa de agar LB que contenía kanamicina. Además, los ADN cromosómicos de estos clones diana se amplificaron mediante PCR, y se seleccionó una variante de la cual se pudo amplificar un fragmento de aproximadamente 3,3 kpb que indica la sustitución del gen pgi con el gen resistente a la kanamicina. La variante obtenida se denominó variante de delección del gen pgi de la cepa B (en lo sucesivo abreviado en ocasiones como "variante B $\Delta$ pgi").

Aquí, la cepa de *Escherichia coli* MG1655 y la cepa de *Escherichia coli* B están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection).

#### [Ejemplo 4]

<Preparación de la variante plaaa/B $\Delta$ pgi>

Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de bases de genes de tiolasa y CoA transferasa de *Escherichia coli* ya han sido publicadas. Es decir, el gen que codifica la tiolasa se describe en 2324131 a 2325315 de la secuencia genómica de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 descrita en el número de acceso de GenBank U00096. Además, el gen que codifica la CoA transferasa se describe en 2321469 a 2322781 de la secuencia genómica de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 antes mencionada. La expresión de estos genes junto con el gen de la

acetoacetato descarboxilasa descrito más adelante y el gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa de las bacterias del género *Clostridium* permite la producción de alcohol isopropílico.

5 Con el fin de obtener el gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 como molde y usando aatatgcatgctggtggaacatatgaaaggtttgcaatgctagg (SEQ ID NO: 20) y gcggatccggtaccttataataactactgctttaattaagtc (SEQ ID NO: 21), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción SphI y BamHI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de alcohol isopropílico deshidrogenasa de aproximadamente 1,1 kpb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pBRgapP preparado en el Ejemplo 2 con las enzimas de restricción SphI y BamHI, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina y el plásmido pGAP-IPAdh se recuperó de las células bacterianas obtenidas.

20 Para obtener el gen de tiolasa de *Escherichia coli*, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR utilizando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando atggatccgctggtggaacatatgaaaaattgtgtcatcgtcag (SEQ ID NO: 22) y gcagaagctgtctagattaattcaaccgttcaatcaccatc (SEQ ID NO: 23), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de tiolasa de aproximadamente 1,2 kpb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pGAP-IPAdh preparado anteriormente con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, y el plásmido pGAP-IPAdh-atoB se recuperó de las células bacterianas obtenidas.

30 Para obtener el gen de la CoA transferasa de *Escherichia coli*, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR utilizando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando gctctagagctggtggaacatatgaaaacaaaattgatgacattacaagac (SEQ ID NO: 24) y tagcaagcttactcagtgattttgctctctctgtgaaacg (SEQ ID NO: 25), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción XbaI y HindIII, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la subunidad  $\alpha$  de la CoA transferasa de aproximadamente 600 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pGAP-IPAdh-atoB preparado anteriormente con las enzimas de restricción XbaI y HindIII, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, y el plásmido pGAP-IPAdh-atoB-atoD se recuperó de las células bacterianas obtenidas.

45 La amplificación por un método de PCR se llevó a cabo usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando aagtctcgagctggtggaacatatggatgcgaaacaacgtattg (SEQ ID NO: 26) y ggccaagcttcataatcaccocctgtgc (SEQ ID NO: 27) y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción XhoI y HindIII, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la subunidad  $\beta$  de la CoA transferasa de aproximadamente 600 pb se obtuvo. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pGAP-IPAdh-atoB-atoD preparado anteriormente con las enzimas de restricción XhoI y HindIII, y los fragmentos mixtos se ligaron usando una ligasa. A continuación, células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, y el plásmido pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA se recuperó de las células bacterianas obtenidas.

55 Con el fin de obtener el gen de la acetoacetato descarboxilasa, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 como molde y usando caggtaccgctggtggaacatatgtaaaaggatgaagtaattaaacaaattagc (SEQ ID NO: 28) y gcggatccttactaagataatcatatataacttcagc (SEQ ID NO: 29) y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción KpnI y BamHI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de acetoacetato descarboxilasa de aproximadamente 700 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA preparado anteriormente con las enzimas de restricción KpnI y BamHI, y los fragmentos mixtos se ligaron usando una ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, y el plásmido pGAP-IPAdh-Adc-atoB-atoD-atoA se recuperó de las células bacterianas obtenidas, y se denominó plaa.

Las células competentes de *Escherichia coli* BΔpgi preparadas en el Ejemplo 3 se transformaron con el plásmido plaaa, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, en una placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* plaaa/BΔpgi.

## 5 [Ejemplo 5]

<Preparación de la variante B::atoDABΔpgi>

10 B::atoDAB preparada en el Ejemplo 1 se transformó con pTH18cs1-pgi preparado en el Ejemplo 3, y se cultivó a 30 °C durante la noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina, y se cultivaron a 30 °C durante la noche. A continuación, se aplicó parte de este líquido de cultivo a una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina, y se aplicaron a una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

20 De las colonias que aparecieron, se seleccionaron 100 colonias aleatoriamente, y cada una creció individualmente en una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron los clones sensibles al cloranfenicol que crecieron solo en la placa de agar LB que contenía kanamicina. Además, los ADN cromosómicos de estos clones diana se amplificaron mediante PCR, y se seleccionó una variante a partir de la cual se pudo amplificar un fragmento de aproximadamente 3,3 kpb que indica el reemplazo del gen pgi con el gen resistente a la kanamicina. La variante obtenida se denominó variante cepa B genoma atoD mejorado - deleción del gen pgi (en lo sucesivo abreviado en ocasiones como "variante B::atoDABΔpgi").

Aquí, la cepa de *Escherichia coli* MG1655 y la cepa de *Escherichia coli* B están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection).

## 30 [Ejemplo 6]

<Preparación de la variante B::atoDABΔgntR>

35 Se conoce la secuencia de bases completa del ADN genómico de *Escherichia coli* (número de acceso GenBank CP000819), y la secuencia de bases que codifica GntR está descrita en 3509184 a 3510179 de la secuencia genómica de la cepa de *Escherichia coli* B, la cual está descrita en el número de acceso GenBank CP000819. Con el fin de clonar una región que flanquea a una secuencia de bases que codifica GntR (gntR), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores de oligonucleótidos representados por ggaattcgggtcaattttcacctctatc (SEQ ID NO: 30), gtgggcccgtctgaaggtacaaaagagatagattctc (SEQ ID NO: 31), ctctttgtacctcaggacggccacaaattgaag (SEQ ID NO: 32) y ggaattcccagcccggcaaggccgatgac (SEQ ID NO: 33). Cada uno de los cebadores de SEQ ID NOs: 30 y 33 tiene un sitio de reconocimiento de EcoRI en el lado 5' terminal del mismo.

45 Se preparó el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* B (número de acceso GenBank CP000819) y se llevó a cabo la PCR usando el ADN genómico obtenido como molde y usando un par de cebadores de SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (en lo sucesivo denominado en ocasiones "fragmento gntR-L"). Además, la PCR se llevó a cabo usando un par de cebadores de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (en lo sucesivo denominado en ocasiones "fragmento gntR-R"). Estos fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en agarosa y se recuperaron. La PCR se llevó a cabo usando los fragmentos gntR-L y gntR-R como moldes y usando un par de cebadores de SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 33, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kb (en lo sucesivo denominado en ocasiones como "fragmento gntR-LR"). Este fragmento gntR-LR se separó por electroforesis en agarosa, se recuperó, se digirió con EcoRI, y se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo un plásmido pTH18cs1 sensible a la temperatura (número de registro de GenBank AB019610) con EcoRI. Los fragmentos mezclados se hicieron reaccionar usando ADN ligasa de T4. A continuación, las células competentes de *Escherichia coli* DH5α (fabricado por Toyobo Co., Ltd.) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C. Los plásmidos se recuperaron de los transformantes obtenidos, y se confirmó que el fragmento gntLR se había insertado adecuadamente en pTH18cs1. El plásmido obtenido se denominó pTH18cs1-gntR.

60 La variante de *Escherichia coli* B::atoDAB preparada en el Ejemplo 1 se transformó con el plásmido pTH18cs1-gntR así obtenido, y se cultivó a 30 °C durante la noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante la noche. A continuación, se aplicó parte de este líquido de cultivo a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de kanamicina y cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C

durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una creció individualmente en una placa de agar LB y en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles al cloranfenicol. Además, los ADN cromosómicos de estos clones diana se amplificaron mediante PCR, y se seleccionó una variante a partir de la cual se pudo amplificar un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb que indica la eliminación del gen *gntR*. La variante obtenida se denominó variante cepa B genoma *atoD* mejorado - deleción del gen *gntR* (en lo sucesivo abreviado en ocasiones como "variante B::*atoDABΔgntR*").

#### [Ejemplo 7]

<Preparación de la variante *pGAP-la/B::atoDABΔgntR*>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::*atoDABΔgntR* preparada en el Ejemplo 6 se transformaron con el plásmido *pla* preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* *pla/B::atoDABΔgntR*.

#### [Ejemplo 8]

<Preparación de la variante *plaz/B::atoDABΔgntR*>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::*atoDABΔgntR* preparada en el Ejemplo 6 se transformaron con el plásmido *plaz* preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* *plaz/B::atoDABΔgntR*.

#### [Ejemplo 9]

<Preparación de la variante B::*atoDABΔpgiΔgntR*>

La variante de *Escherichia coli* B::*atoDABΔpgi* preparada en el Ejemplo 5 se transformó con el plásmido *pTH18cs1-gntR* preparado en el Ejemplo 6, y se cultivó a 30 °C durante la noche en un Caldo LB, placa de agar Miller que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante la noche. A continuación, se aplicó parte de este líquido de cultivo a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de kanamicina y cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una creció individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles al cloranfenicol. Además, los ADN cromosómicos de estos clones diana se amplificaron mediante PCR, y se seleccionó una variante a partir de la cual se pudo amplificar un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb que indica la deleción del gen *gntR*. La variante obtenida se denominó variante cepa B genoma *atoD* mejorado - deleción del gen *pgi* - deleción del gen *gntR* (en adelante abreviado en ocasiones como "variante B::*atoDABΔpgiΔgntR*").

Aquí, la cepa de *Escherichia coli* MG1655 y la cepa de *Escherichia coli* B están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection).

#### [Ejemplo 10]

<Preparación de la variante *pla/B::atoDABΔpgiΔgntR*>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::*atoDABΔpgiΔgntR* preparada en el Ejemplo 9 se transformaron con el plásmido *pla* preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo *Escherichia coli* *pla/B::atoDABΔpgiΔgntR*.

#### [Ejemplo 11]

<Preparación de la variante *plaz/B::atoDABΔpgiΔgntR*>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::*atoDABΔpgiΔgntR* preparada en el Ejemplo 9 se transformaron con el plásmido *plaz* preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo

LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* plaz/B::atoDABΔpgiΔgntR.

### [Ejemplo 12]

5

<Preparación de la variante B::atoDABΔgnd>

Con el fin de clonar una región que flanquea la secuencia de bases de un gen que codifica la fosfogluconato deshidrogenasa (gnd), se sintetizaron cuatro tipos de cebadores de oligonucleótidos representados por cgccatgatgaatggcgcggcggggccggtgg (SEQ ID NO: 34), tggagctctgtttactctgtcaggggg (SEQ ID NO: 35), tggagctctctgatttaacaacaataaaattg (SEQ ID NO: 36) y cgggatccaccaccataaccaaacgacgg (SEQ ID NO: 37). El cebador de SEQ ID NO: 34 tiene un sitio de reconocimiento NdeI en el lado 5' terminal del mismo, y cada uno de los cebadores de SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 tiene un sitio de reconocimiento SacI en el lado 5' terminal del mismo. Además, el cebador de SEQ ID NO: 37 tiene un sitio de reconocimiento BamHI en el lado 5' terminal del mismo.

El ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* B (N.º de acceso GenBank CP000819), y la PCR se llevó a cabo usando un par de cebadores de SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (en lo sucesivo denominado en ocasiones como "fragmento gnd-L"). Además, la PCR se llevó a cabo utilizando un par de cebadores de SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb (en lo sucesivo denominado como "fragmento gnd-R"). Estos fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en agarosa y se recuperaron. El fragmento gnd-L se digirió con NdeI y SacI, y el fragmento gnd-R se digirió con SacI y BamHI. Estos dos tipos de fragmentos digeridos se mezclaron con un fragmento obtenido digiriendo un plásmido pTH18cs1 sensible a la temperatura (número de acceso de GenBank AB019610) con NdeI y BamHI, y los fragmentos mezclados se dejaron reaccionar usando ADN ligasa de T4. A continuación, células competentes de *Escherichia coli* DH5α (fabricado por Toyobo Co., Ltd.) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol a 30 °C. Los plásmidos se recuperaron de los transformantes obtenidos, y se confirmó que los dos fragmentos de un fragmento de la región flanqueante en dirección 5' y un fragmento de la región flanqueante en dirección 3' del gen que codifica gnd se habían insertado adecuadamente en pTH18cs1. El plásmido obtenido se denominó pTH18cs1-gnd.

La variante de *Escherichia coli* B::atoDAB preparada en el Ejemplo 1 se transformó con el plásmido pTH18cs1-gnd así obtenido, y se cultivó a 30 °C durante la noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante la noche. A continuación, se aplicó parte de este líquido de cultivo a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de kanamicina y cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

De las colonias que aparecieron, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una creció individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles al cloranfenicol. Además, los ADN cromosómicos de estos clones diana se amplificaron mediante PCR, y se seleccionó una variante a partir de la cual se pudo amplificar un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb que indica la eliminación del gen gnd. La variante obtenida se denominó variante B::atoDABΔgnd.

Aquí, la cepa de *Escherichia coli* B está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection).

50

### [Ejemplo 13]

<Preparación de la variante pla/B::atoDABΔgnd>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔgnd preparada en el Ejemplo 12 se transformaron con el plásmido pla preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* pla/B::atoDABΔgnd.

### [Ejemplo 14]

60

<Preparación de la variante plaz/B::atoDABΔgnd>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔgnd preparada en el Ejemplo 12 se transformaron con el plásmido plaz preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de

65

*Escherichia coli* plaz/B::atoDABΔgnd.

#### [Ejemplo 15]

5 <Preparación de la variante B::atoDABΔpgiΔgnd>

La variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgi preparada en el Ejemplo 5 se transformó con el plásmido pTH18cs1-gnd preparado en el Ejemplo 12, y se cultivó a 30 °C durante la noche en una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante la noche. A continuación, se aplicó parte de este líquido de cultivo a una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de kanamicina y cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

15 De las colonias que aparecieron, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una creció individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles al cloranfenicol. Además, los ADN cromosómicos de estos clones diana se amplificaron mediante PCR, y se seleccionó una variante a partir de la cual se pudo amplificar un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb que indica la eliminación del gen gnd. La variante obtenida se denominó variante B::atoDABΔpgiΔgnd.

#### [Ejemplo 16]

25 <Preparación de la variante pla/B::atoDABΔpgiΔgnd>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgnd preparadas el Ejemplo 15 se transformaron con el plásmido pla preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 μg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo *Escherichia coli* pla/B::atoDABΔpgiΔgnd.

#### [Ejemplo 17]

<Preparación de la variante plaz/B::atoDABΔpgiΔgnd>

35 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgnd preparada en el Ejemplo 15 se transformó con el plásmido plaz preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 μg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* plaz/B::atoDABΔpgiΔgnd.

#### [Ejemplo 18]

<Preparación de la variante B::atoDABΔgndΔgntR>

45 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔgnd preparada en el Ejemplo 12 se transformaron con el plásmido pTH18cs1-gntR preparado en el Ejemplo 6, y se cultivaron a 30°C durante la noche en una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante la noche. A continuación, se aplicó parte de este líquido de cultivo a una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de kanamicina y cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

50 De las colonias que aparecieron, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una creció individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 μg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles al cloranfenicol. Además, los ADN cromosómicos de estos clones diana se amplificaron mediante PCR, y se seleccionó una variante a partir de la cual se pudo amplificar un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb que indica la delección del gen gntR. La variante obtenida se denominó variante B::atoDABΔgndΔgntR.

#### [Ejemplo 19]

60 <Preparación de la variante pla/B::atoDABΔgndΔgntR>

65 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔgndΔgntR preparada en el Ejemplo 18 se transformaron con el plásmido pla preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 μg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* pla/B::atoDABΔgndΔgntR.

**[Ejemplo 20]**

<Preparación de la variante plaz/B::atoDABΔgndΔgntR>

5 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔgndΔgntR preparada en el Ejemplo 18 se transformaron con el plásmido plaz preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* plaz/B::atoDABΔgndΔgntR.

10 **[Ejemplo 21]**

<Preparación de la variante B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR>

15 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgnd preparada en el Ejemplo 15 se transformaron con el plásmido pTH18cs1-gntR preparado en el Ejemplo 6, y se cultivaron a 30 °C durante la noche en una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron transformantes. Los transformantes obtenidos se inocularon en un medio líquido LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 30 °C durante la noche. A continuación, se aplicó parte de este líquido de cultivo a una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de kanamicina y cloranfenicol, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30 °C durante 24 horas en un medio líquido LB, y se aplicaron a una placa de agar LB, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecieron a 42 °C.

20 De las colonias que aparecieron, se seleccionaron aleatoriamente 100 colonias, y cada una creció individualmente en una placa de agar LB y una placa de agar LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles al cloranfenicol. Además, los ADN cromosómicos de estos clones diana se amplificaron mediante PCR, y se seleccionó una variante a partir de la cual se pudo amplificar un fragmento de aproximadamente 2,0 kpb que indica la deleción del gen gntR. La variante obtenida se denominó variante B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR.

30 **[Ejemplo 22]**

<Preparación de la variante pla/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR>

35 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR preparada en el Ejemplo 21 se transformaron con el plásmido pla preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante una noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* pla/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR.

**[Ejemplo 23]**

40 <Preparación de la variante plaz/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR>

45 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR preparada en el Ejemplo 21 se transformaron con el plásmido plaz preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* plaz/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR.

**[Ejemplo 24]**

50 <Preparación de la variante pla/B::atoDAB>

55 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDAB preparada en el Ejemplo 1 se transformaron con el plásmido pla preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* pla/B::atoDAB.

**[Ejemplo 25]**

<Preparación de la variante plaz/B::atoDABΔpgi>

60 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgi preparada en el Ejemplo 5 se transformaron con el plásmido plaz preparado en el Ejemplo 2, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* plaz/B::atoDABΔpgi.

65

**[Ejemplo de prueba 1]**

(Producción de alcohol isopropílico)

5 En este ejemplo, se produjo alcohol isopropílico usando un aparato de producción mostrado en la Fig. 1 del documento WO 2009/008377. El tanque de cultivo utilizado era un tanque que tenía una capacidad de 3 l y era de vidrio, y los tanques trampa utilizados eran tanques con una capacidad de 10 l y eran de polipropileno. En los tanques trampa, se inyectó agua como solución trampa (agua trampa) en una cantidad de 9 l por tanque, y los dos tanques trampa se conectaron para su uso. El tanque de cultivo estaba equipado con un tubo de drenaje, y el líquido de cultivo se incrementó mediante la alimentación de azúcar y se descargó un neutralizador fuera del tanque de cultivo, según correspondiera.

Una lista de variantes utilizadas en la evaluación de la producción de alcohol isopropílico se muestra en la Tabla 3.

15 Tabla 3

Nombre de la variante	Característica	Descripción referenciada
pla/B::atoDAB	Contiene sistema de producción de AIP	Ejemplo 24
plaz/B::atoDAB	Contiene sistema de producción de AIP, alta expresión de zwf	Ejemplo 2
plaaa/BΔpgi	Contiene sistema de producción de AIP, Δpgi	Ejemplo 4
plaz/B::atoDABΔpgi	Contiene sistema de producción de AIP, alta expresión de zwf, Δpgi	Ejemplo 25
pla/B::atoDABΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP, ΔgntR	Ejemplo 7
plaz/B::atoDABΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP, alta expresión de zwf, ΔgntR	Ejemplo 8
pla/B::atoDABΔpgiΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP, Δpgi, ΔgntR	Ejemplo 10
plaz/B::atoDABΔpgiΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP, alta expresión de zwf, Δpgi, ΔgntR	Ejemplo 11
pla/B::atoDABΔpgiΔgnd	Contiene sistema de producción de AIP, Δpgi, Δgnd	Ejemplo 16
pla/B::atoDABΔgndΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP, Δgnd, ΔgntR	Ejemplo 19
plaz/B::atoDABΔgndΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP, alta expresión de zwf, Δgnd, ΔgntR	Ejemplo 20
pla/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP, Δpgi, Δgnd, ΔgntR	Ejemplo 22
plaz/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP, alta expresión de zwf, Δpgi, Δgnd, ΔgntR	Ejemplo 23

AIP se refiere a alcohol isopropílico

Como precultivo, cada una de las variantes a evaluar se inoculó individualmente en un matraz Erlenmeyer que tiene una capacidad de 500 ml y contiene 50 ml de un caldo LB, líquido de cultivo Miller (Difco 244620) que contiene 50 µg/ml de ampicilina y se cultivó durante la noche a una temperatura de cultivo de 30 °C mientras se agita a 120 rpm. Se transfirieron 45 ml del precultivo a un tanque de cultivo (dispositivo de cultivo BMS-PI fabricado por ABLE Corporation) que tenía una capacidad de 3 l y que contenía 855 g de un medio de cultivo que tenía la siguiente composición, y se cultivó. El cultivo se llevó a cabo a un volumen de aireación de 0,9 l/min, una velocidad de agitación de 550 rpm, una temperatura de cultivo de 30 °C y un pH de 7,0 (ajustado con solución acuosa de NH<sub>3</sub>) a presión atmosférica. Se añadió una solución acuosa de glucosa 50 % p/p con un caudal de 10 g/l/hora durante el período desde el inicio del cultivo hasta 8 horas después del inicio del cultivo y, a partir de entonces, se añadió una solución acuosa de glucosa 50 % p/p a un caudal de 20 g/l/hora, según fuera apropiado, de modo que se minimizara la cantidad de glucosa que quedaba en el tanque de cultivo. El líquido de cultivo bacteriano se muestreó varias veces durante el período desde el inicio del cultivo hasta 72 horas después del inicio del cultivo y, después de que las células bacterianas se eliminaron por operación centrífuga, las cantidades de alcohol isopropílico y acetona se acumularon en los sobrenadantes del cultivo y las aguas trampa obtenidas se midieron por HPLC de acuerdo con un método ordinario. Cada uno de los valores de medición es una suma de las cantidades en el líquido de cultivo y los dos tanques trampa después del cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

<Composición del medio de cultivo>

35 Licor de maceración de maíz (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.): 20 g/l  
 Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0,1 g/l  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2 g/l  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2 g/l

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 2 g/l  
 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2 g/l  
 ADEKA NOL LG126 (ADEKA Corporation) 0,1 g/l  
 (Equilibrio: agua)

5

Tabla 4

Nombre de la variante	Cantidad de producción de AIP (g/l/72 h)	Cantidad de producción de acetona (g/l/72 h)
pla/B::atoDAB (control negativo)	48,7	27,6
plaz/B::atoDAB	39,4	20,2
plaaa/BΔpgi	0,0	0,0
plaz/B::atoDABΔpgi	41,1	3,0
pla/B::atoDABΔgntR	57,3	23,7
plaz/B::atoDABΔgntR	33,3	25,0
pla/B::atoDABΔpgiΔgntR	9,6	0,8
plaz/B::atoDABΔpgiΔgntR	70,2	10,6
pla/B::atoDABΔpgiΔgnd	2,6	0,2
pla/B::atoDABΔgndΔgntR	28,6	28,4
plaz/B::atoDABΔgndΔgntR	33,9	25,3
pla/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR	0,8	0,0
plaz/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR	75,6	14,1

10 Como resultado de la evaluación, la cantidad producida de alcohol isopropílico por un control negativo (pla/B::atoDAB) fue 48,7 g/l/72 h, y la cantidad producida por un alterador de gntR (pla/B::atoDABΔgntR) fue 57,3 g/l/72 h. A partir de este resultado, se encontró que la alteración de gntR proporciona una productividad incrementada que es aproximadamente 1,2 veces mayor que la del control negativo.

15 Además, la cantidad de producción lograda por una variante en la que gntR y pgi fueron alterados y en la que aumentó la expresión de zwf (plaz/B::atoDABΔpgiΔgntR) fue de 70,2 g/l/72 h, lo que indica una productividad que es de aproximadamente 1,4 veces la del control negativo. A partir de este resultado, se observó que la alteración tanto de gntR como de pgi en combinación con la mejora de la expresión de zwf mejora adicionalmente la productividad en comparación con el caso de la alteración de gntR solo.

20 En el caso de la alteración de pgi solo (plaaa/BΔpgi), no se produjo alcohol isopropílico en absoluto. En el caso del aumento de zwf solo (plaz/B::atoDAB), la cantidad de producción fue de 39,4 g/l/72 h, y la productividad disminuyó en lugar de aumentar.

25 Las cantidades de producción en el caso de la alteración de gntR en combinación con una alta expresión de zwf (plaz/B::atoDABΔgntR), en el caso de la alteración de pgi en combinación con una alta expresión de zwf (plaz/B::atoDABΔpgi), y en el caso de la alteración de pgi y gntR (pla/B::atoDABΔpgiΔgntR) fueron 33,3 g/l/72 h, 41,1 g/l/72 h, y 9,6 g/l/72 h, respectivamente, y la eficiencia de la producción de alcohol isopropílico disminuyó en lugar de aumentar.

30 Por lo tanto, en un caso en el que se lleva a cabo la alteración o la alta expresión de otros factores además de la alteración de gntR, se considera que el efecto en términos de mejora de la productividad lograda por la variante plaz/B::atoDABΔpgiΔgntR se obtiene cuando ambos gntR y pgi están alterados y zwf se expresa en altos niveles.

35 Además, en un caso en el que gnd se altera adicionalmente en la variante plaz/B::atoDABΔpgiΔgntR que exhibe una productividad incrementada, es decir, en un caso en el que pgi, gntR y gnd están alterados y zwf se expresa en altos niveles (plaz/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR), la cantidad de alcohol isopropílico producida fue de 75,6 g/l/72 h, lo que indica una alta productividad que es mayor que la alcanzada por la variante plaz/B::atoDABΔpgiΔgntR.

40 En el caso de la alteración de gnd solo, la cantidad de alcohol isopropílico producida fue de 45,5 g/l/72 h, que es inferior a la conseguida por el control negativo. Es decir, la alteración de gnd solo no mostró un efecto en términos de mejora de la eficacia de la producción de alcohol isopropílico. Las cantidades de producción en el caso de la alteración de gntR y gnd (pla/B::atoDABΔgndΔgntR), en el caso de la alteración de pgi y gnd (pla/B::atoDABΔpgiΔgnd) y en el caso de la alteración de pgi, gntR y gnd (pla/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR) fueron 28,6 g/l/72 h, 2,6 g/l/72 h, y 0,8 g/l/72 h, respectivamente, lo que indica que estas variantes exhibieron una disminución de la eficacia de producción de alcohol isopropílico en lugar de un aumento de la eficiencia de producción de alcohol isopropílico. La eficiencia de la producción de alcohol isopropílico disminuyó en lugar de aumentar también en un caso en el que gnd se alteró y zwf se expresó a altos niveles (plaz/B::atoDABΔgnd), en un caso en el que gntR y gnd se alteraron y zwf se expresó a altos niveles (plaz/B::atoDABΔgndΔgntR), y en un caso en el que pgi y gnd se alteraron y zwf se expresó a altos niveles (plaz/B::atoDABΔpgiΔgnd) y las productividades en tales casos fueron 40,7 g/l/72 h, 33,9 g/l/72 h y 34,9 g/l/72 h, respectivamente.

50

Por lo tanto, se considera que el efecto en términos de mejora de la productividad lograda por la variante plaz/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR se obtiene solo en un caso en el que gntR, pgi y gnd se alteran simultáneamente y en los que zwf se expresa fuertemente.

- 5 Además, la acetona obtenida se puede usar como materia prima para la producción de alcohol isopropílico, después de la purificación de la misma.

(Fabricación de acetona)

10 **[Ejemplo 26]**

<Recuperación de alcohol isopropílico y acetona>

- 15 El agua de trampa obtenida cuando se realizó la evaluación del cultivo de la variante plaz/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR (Ejemplo 23) se analizó mediante cromatografía de gases (GC) y, como resultado, se determinó que contenía 1,2 g/l de acetona y 4.3 g/l de alcohol isopropílico. A partir de la solución acuosa que contenía alcohol isopropílico y acetona (agua de trampa muestreada 72 horas después del inicio del cultivo), se recuperaron alcohol isopropílico y acetona a concentraciones más altas por destilación.

- 20 Específicamente, 2 l de la solución acuosa descrita anteriormente se pasó primero a través de una columna rellena con 250 ml de resina de intercambio catiónico (AMBERLYST 31 WET fabricada por Organo Corporation) a un caudal de 500 ml/h, eliminándose amoníaco residual etc. La solución resultante se destiló a presión normal. Una fracción obtenida en puntos de ebullición de 53 a 81,6 °C fue muestreada, y analizada por GC, y se determinó que contenía 18,7 % en masa de acetona, 62,6 % en masa de alcohol isopropílico, 0,2 % en masa de componentes no identificados y el resto agua. La fracción se usó como materia prima para la siguiente reacción de deshidrogenación.

- 25 <Preparación del catalizador de deshidrogenación ZnO:ZrO<sub>2</sub> (94:6)>

- 30 Se añadieron 15,94 g (0,15 mol) de carbonato de sodio y 130 ml de agua a un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con paletas de agitación, para formar una solución. A la solución acuosa resultante, se añadió gota a gota durante una hora y media una solución acuosa obtenida disolviendo 34,36 g (0,11 mol) de nitrato de zinc hexahidratado y 1,30 g (0,05 mol) de óxido de dinitrato de zirconio dihidratado en 150 ml de agua. El resultante se dejó reposar durante 5 días, luego se filtró y se lavó bien con agua. La materia blanca resultante se secó a 120 °C durante 2 horas, y a 400 °C durante 1 hora, y, finalmente, se calcinó a 600 °C durante 2 horas. Se obtuvo como polvo blanco 9,50 g de un catalizador de óxido complejo, ZnO:ZrO<sub>2</sub> (94:6).

- 35 <Producción de acetona>

- 40 Se añadió 1,0 g del catalizador de óxido complejo ZnO:ZrO<sub>2</sub> (94:6) (moldeado por compresión a 20 MPa y cuyo tamaño determinado posteriormente fue de 250 a 500 μm) se añadió a un reactor de SUS con un diámetro de 1 cm y una longitud de 40 cm, y el destilado obtenido anteriormente (acetona: 18,7 % en masa, alcohol isopropílico: 62,6 % en masa, componentes no identificados: 0,2 % en masa, el resto: agua) se dejó fluir a través del reactor a 350 °C a una velocidad de 1,50 g/hora bajo una corriente de nitrógeno de 10 ml/min. Se enfrió un puerto de salida del reactor, atrapando así la solución de reacción y el gas de reacción. La muestra de producto obtenida a las 5 horas después del inicio de la reacción se analizó mediante cromatografía de gases y, como resultado, se determinó que la acetona se producía a alta concentración como se muestra en la Tabla 5. En la Tabla 5, "IPA" representa alcohol isopropílico (lo mismo se aplicará a partir de ahora).

45 **[Ejemplo 27]**

- 50 Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo 26, excepto que la temperatura de reacción se ajustó a 400 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Como se muestra en la Tabla 5, se produjo acetona a alta concentración.

55 **[Ejemplo 28]**

<Preparación del catalizador de deshidrogenación ZnO:ZrO<sub>2</sub> (88:12)>

- 60 Se añadieron 15,94 g (0,15 mol) de carbonato de sodio y 130 ml de agua a un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con paletas de agitación, para formar una solución. A la solución acuosa resultante, se añadió gota a gota durante una hora y media una solución acuosa obtenida disolviendo 32,86 g (0,11 moles) de nitrato de zinc hexahidratado y 2,66 g (0,10 mol) de óxido de dinitrato de zirconio dihidratado en 150 ml de agua. El resultante se dejó reposar durante 5 días, luego se filtró y se lavó bien con agua. La materia blanca resultante se secó a 120 °C durante 2 horas, y a 400 °C durante 1 hora, y, finalmente, se calcinó a 600 °C durante 2 horas. Se obtuvo como polvo blanco 9,94 g de un catalizador de óxido complejo, ZnO:ZrO<sub>2</sub> (88:12).

- 65

## &lt;Producción de acetona&gt;

Se añadió 1,0 g del catalizador de óxido complejo ZnO:ZrO<sub>2</sub> (88:12) (moldeado por compresión a 20 MPa y cuyo tamaño determinado posteriormente fue de 250 a 500 µm) se añadió a un reactor de SUS con un diámetro de 1 cm y una longitud de 40 cm, y el destilado obtenido anteriormente (acetona: 18,7 % en masa, alcohol isopropílico: 62,6 % en masa, componentes no identificados: 0,2 % en masa, el resto: agua) se dejó fluir a través del reactor a 350 °C a una velocidad de 1,50 g/h bajo una corriente de nitrógeno de 10 ml/min. Se enfrió un puerto de salida del reactor, atrapando así la solución de reacción y el gas de reacción. Se obtuvo una muestra del producto a las 5 horas después del inicio de la reacción y se analizó mediante cromatografía de gases y, como resultado, se descubrió que se producía acetona a alta concentración como se muestra en la Tabla 5.

**[Ejemplo 29]**

Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo 28, excepto que la temperatura de reacción se ajustó a 400 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Como se muestra en la Tabla 5, se produjo acetona a alta concentración.

Tabla 5

	Catalizador	Temperatura de reacción	Relación de conversión de AIP (%)	Composición de productos distintos del AIP (en términos de % en moles/alcohol isopropílico)				
				Acetona	Propileno	Óxido de mesitilo	Metil isobutil cetona	Otros
Ejemplo 26	ZnO : ZrO <sub>2</sub> (94:6)	350 °C	97,8	78,3	8,4	3,9	0,2	9,2
Ejemplo 27	ZnO : ZrO <sub>2</sub> (94:6)	400 °C	99,6	71,9	6,1	4,6	0,3	17,1
Ejemplo 28	ZnO : ZrO <sub>2</sub> (88:12)	350 °C	83,5	89,8	1,0	2,4	0,1	6,7
Ejemplo 29	ZnO : ZrO <sub>2</sub> (88:12)	400 °C	99,0	80,0	1,3	3,5	0,1	15,1

(Modificación del codón del gen contenido en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico)

Las secuencias de codones del gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa y el gen de la acetoacetato deshidrogenasa contenidas en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la invención se modificaron, y se verificó la eficacia en la producción de alcohol isopropílico y acetona como se describe a continuación.

**[Ejemplo 30]**

## &lt;Preparación del plásmido pl\*a\*z&gt;

Un gen de la acetoacetato descarboxilasa (adc) de la bacteria *Clostridium* está descrito con el número de acceso GenBank M55392, y un gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa (IPAdh) está descrito con el número de acceso GenBank AF157307.

La secuencia promotora de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (en lo sucesivo denominada en ocasiones "GAPDH") de *Escherichia coli*, que se describe en 397 a 440 en la información de la secuencia de bases con un número de acceso de GenBank X02662, puede usarse como la secuencia de bases de un promotor necesario para expresar el grupo de genes mencionado anteriormente.

Con el fin de obtener el promotor GAPDH, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde y usando cgagctacatgcaatgattgacacgattccg (SEQ ID NO: 38) y cgcgcgcatgctattgttagtgaataaaagg (SEQ ID NO: 39), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción NdeI y SphI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 110 pb correspondiente al promotor GAPDH. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pBR322 (número de acceso de GenBank J01749) con las enzimas de restricción NdeI y SphI, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5α (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y el plásmido pBRgapP se recuperó de las células bacterianas obtenidas.

Con el fin de obtener un gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa con modificación de codones (IPAdh\*), se diseñó un gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa con modificación de codones basado en la secuencia de aminoácidos del gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 y se preparó el siguiente fragmento de ADN (SEQ ID NO: 40) por síntesis de ADN. La secuencia del mismo se muestra a continuación.

5

ATGAAAGGTTTTGCAATGCTGGGTATTAATAAGCTGGGCTGGATCGAAAAAGAGCG  
 CCCGTTGCGGGTTCGTATGATGCGATTGTGCGCCACTGGCCGTATCTCCGTGTAC  
 CTCAGATATCCATACCGTTTTTGAGGGAGCTCTTGGCGACCGCAAGAATATGATTTT  
 AGGGCATGAAGCGGTGGGTGAAGTTGTGGAGGTAGGCAGTGAAGTGAAGGATTT  
 CAAACCTGGTGACCGTGTTCGTCCCTTGCACAACCCCGGATTGGCGGTCTTTGG  
 AAGTTCAGGCTGGTTTTCAACAGCACTCAAACGGTATGCTCGCAGGATGGAAATTT  
 TCCAACCTCAAGGATGGCGTCTTTGGTGAGTATTTTCATGTGAATGATGCGGATATG  
 AATCTTGCGATTCTGCCTAAAGACATGCCCTGGAAAACGCTGTTATGATCACAGA  
 TATGATGACTACGGGCTTCCACGGAGCCGAACCTTGCAGATATTCAGATGGGTTCAA  
 GTGTAGTGGTCATTGGCATTGGCGCGGTTGGCCTGATGGGGATAGCCGGTGCTAAA  
 TTACGTGGAGCAGGTTCGGATCATTGGCGTGGGGAGCCGCCCGATTTGTGTCGAGG  
 CTGCCAAATTTTACGGGGCCACCGACATTTGAATTATAAAAATGGTCATATCGTTG  
 ATCAAGTCATGAAACTGACGAACGGAAAAGGCGTTGACCGCGTGATTATGGCAGG  
 CGGTGGTAGCGAAACACTGTCCCAGGCCGTATCTATGGTCAAACCAGGCGGGATC  
 ATTTCGAATATAAATTATCATGGAAGTGGCGATGCGTTATTGATCCCGCGTGTGGAA  
 TGGGGGTGCGGAATGGCTCACAAGACTATCAAAGGCGGTCTTTGTCCCGGGGGAC  
 GTTTGAGAGCAGAGATGCTGCGAGATATGGTAGTGTACAACCGTGTTGATCTCAGC  
 AAACCTGGTCACGCATGTATATCATGGGTTTCGATCACATCGAAGAAGCCCTGTTACT  
 GATGAAAGACAAGCCAAAAGACCTGATTAAGCAGTAGTTATATTATAA

10

La amplificación mediante un método de PCR se llevó a cabo usando el fragmento de ADN preparado como molde y usando acatgcatgcatgaaggTTTTGCAATGCTG (SEQ ID NO: 41) y acgctgctgactataataactactgcttaa (SEQ ID NO: 42), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción SphI y Sall, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la alcohol isopropílico deshidrogenasa con modificación de codones de aproximadamente 1,1 kpb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pUC 119 con las enzimas de restricción SphI y Sall, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5α (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformó con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina, y se recuperaron plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que se había insertado correctamente IPAdh\* con modificación de codones. El plásmido obtenido se denominó pUC-I\*.

15

20

25

30

Un fragmento que contiene IPAdh\* obtenido digiriendo el plásmido pUC-I\* con las enzimas de restricción SphI y EcoRI se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pBRgapP con las enzimas de restricción SphI y EcoRI, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5α (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina, y se recuperaron plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que IPAdh\* con modificación de codones se había insertado correctamente. El plásmido obtenido se denominó pGAP-I\*.

Con el fin de obtener un gen de la acetoacetato descarboxilasa con modificación de codones (*adc\**), se diseñó un gen de la acetoacetato descarboxilasa con modificación de codones basado en la secuencia de aminoácidos del gen de la acetoacetato descarboxilasa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, y el siguiente fragmento de ADN (SEQ ID NO: 43) se preparó por síntesis de ADN. La secuencia del mismo se muestra a continuación.

5  
 ATGCTGAAAGATGAAGTGATTAACAGATTAGCACGCCATTA ACTTCGCCTGCATT  
 TCCGCGCGGTCCGTATAAATTCATAATCGTGAATATTTAACATTGTATAACCGTACC  
 GATATGGACGCCCTGCGTAAAGTTGTGCCAGAGCCTCTGGAAATTGATGAGCCCTT  
 AGTCCGGTTCGAAATCATGGCAATGCATGATACGAGTGGCCTGGGTTGCTATACAG  
 AATCAGGTCAGGCTATTCCCGTGAGCTTTAATGGTGTTAAGGGCGACTACCTTCAC  
 ATGATGTATCTGGATAACGAGCCGGCAATTGCCGTAGGTCGGGAATTAAGTGCATA  
 CCCTAAAAGCTCGGGTATCCAAAGCTGTTTGTGGATT CAGACACTCTGGTGGGCA  
 CGTTAGACTATGGAAA ACTGCGTGTTGCGACCGCGACAATGGGGTACAAACATAA  
 AGCCCTGGATGCTAATGAAGCAAAGGATCAAATTTGTCGCCCCGA ACTATATGTTGA  
 AAATCATCCCCAATTATGACGGCTCCCCTCGCATATGCGAGCTTATCAACGCGAAAA  
 TCACCGATGTTACCGTACATGAAGCTTGGACAGGACCGACTCGACTGCAGTTATTC  
 GATCACGCTATGGCGCCACTGAATGACTTGCCGGTCAAAGAGATTGTTTCTAGCTC  
 TCACATTCTTGCCGATATAATCTTGCCGCGCGCGGAAGTCATATACGATTATCTCAA  
 GTAA

10  
 La amplificación mediante un método de PCR se llevó a cabo usando el fragmento de ADN preparado como molde y usando *acgctgctgacgctggttgggaaacatatgctgaaagatgaagtgatta* (SEQ ID NO: 44) and *gctctagacttagagataatcgatatga* (SEQ ID NO: 45), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *Sall* y *XbaI*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de acetoacetato descarboxilasa con modificación de codones de aproximadamente 700 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido *pGAP-I\** preparado anteriormente con las enzimas de restricción *Sall* y *XbaI*, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, y se recuperaron plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que *adc\** se había insertado adecuadamente. El plásmido obtenido se denominó *pl\*a\**.

20  
 Con el fin de obtener el gen de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (*zwf*), se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR utilizando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* B (número de acceso GenBank CP000819) como molde y usando *gctctagacggagaaagtcttatggcgtaacgcaaacagcccagg* (SEQ ID NO: 46) y *cgggatccttactcaaacattccaggaacgac* (SEQ ID NO: 47), y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *XbaI*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa de aproximadamente 1500 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido *pl\*a\** preparado anteriormente con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, y los fragmentos mezclados se ligaron usando una ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron a 37 °C durante la noche en un medio líquido LB que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina, y el plásmido *pl\*a\*z* se recuperó de las células bacterianas obtenidas.

### [Ejemplo 31]

35  
 <Preparación de la variante *pl\*a\*/B::atoDAB $\Delta$ gntR*>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDAB $\Delta$ gntR preparada en el Ejemplo 6 se transformaron con el plásmido *pl\*a\** preparado en el Ejemplo 30, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un

caldo LB, placa de agar Miller que contenía ampicilina 50 µg/ml, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* pl\*a\*/B::atoDABΔgntR.

**[Ejemplo 32]**

5 <Preparación de la variante pl\*a\*/B::atoDABΔpgiΔgntR>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgntR preparada en el Ejemplo 9 se transformaron con el plásmido pla\* preparado en el Ejemplo 30, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo *Escherichia coli* pl\*a\*/B::atoDABΔpgiΔgntR.

**[Ejemplo 33]**

15 <Preparación de la variante pl\*a\*/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR preparada en el Ejemplo 21 se transformaron con el plásmido pl\*a\*/z preparado en el Ejemplo 30, y se cultivaron a 37 °C durante una noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* pl\*a\*/z/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR.

**[Ejemplo 34]**

25 <Preparación de la variante pl\*a\*/B::atoDAB>

Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDAB preparada en el Ejemplo 1 se transformaron con el plásmido pl\*a\*/z preparado en el Ejemplo 30 y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía ampicilina 50 µg/ml, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* pl\*a\*/B::atoDAB.

**[Ejemplo de prueba 2]**

(Producción de alcohol isopropílico)

35 La evaluación de la producción de alcohol isopropílico se llevó a cabo de la misma manera que en el [Ejemplo de Prueba 1] descrito anteriormente. En la Tabla 6 se muestra una lista de las variantes utilizadas en la evaluación. Además, los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 7.

Tabla 6

Nombre de la variante	Características	Descripción referenciada
pl*a*/B::atoDAB	Contiene sistema de producción de AIP (los codones de IPAdh y adc se ha modificado)	Ejemplo 34
pl*a*/B::atoDABΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP (los codones de IPAdh y adc se ha modificado), ΔgntR	Ejemplo 31
pl*a*/z/B::atoDABΔpgiΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP (os codones de IPAdh y adc se ha modificado), altos niveles de expresión de zwf, Δpgi, ΔgntR	Ejemplo 32
pl*a*/z/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR	Contiene sistema de producción de AIP (os codones de IPAdh y adc se ha modificado), altos niveles de expresión de zwf, Δpgi, Δgnd, ΔgntR	Ejemplo 33
AIP se refiere a alcohol isopropílico		

40

Tabla 7

Nombre de la variante	Cantidad de producción de AIP (g/l/72 h)	Cantidad de producción de acetona (g/l/72 h)
pl*a*/B::atoDAB	64,1	36,3
pl*a*/B::atoDABΔgntR	75,5	31,2
pl*a*/z/B::atoDABΔpgiΔgntR	92,5	14,0
pl*a*/z/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR	99,7	18,6

45

La comparación de los resultados mostrados en la Tabla 7 con los resultados mostrados en la Tabla 4 demuestra que la modificación de los codones del gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa y del gen de acetoacetato deshidrogenasa mejora significativamente la eficacia de la producción de alcohol isopropílico.

**[Ejemplo 35]**

(Producción de alcohol isopropílico a partir de sacarosa)

- 5 Se introdujo adicionalmente un gen de la invertasa (*cscA*), que es una enzima que degrada la sacarosa, en la variante pl\*a\*z/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR y se llevó a cabo la producción fermentativa de alcohol isopropílico a partir de sacarosa. Además, se produjo acetona o propileno a partir del líquido de fermentación resultante.

<Preparación de la variante pl\*a\*z-cscA/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR>

- 10 Se conoce la secuencia completa de bases del ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* O157 (número de acceso en GenBank AE005174), y también está descrita la secuencia de bases de un gen que codifica la invertasa (en lo sucesivo denominado en ocasiones como "cscA") de la cepa de *Escherichia coli* O157. Es decir, *cscA* se describe en 3274383 a 3275816 de la secuencia genómica de la cepa de *Escherichia coli* O157, que se describe con el número de acceso en GenBank AE005174.

- 15 Con el fin de obtener la *cscA*, se llevó a cabo la amplificación por un método de PCR usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* O157 como molde y usando gctgttggaacatgatgacgcaatctcgattgcatg (SEQ ID NO: 48) y ttaaccagtgccagagtg (SEQ ID NO: 49), y los extremos del fragmento de ADN resultante se fosforilaron utilizando la polinucleótido quinasa de T4, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de *cscA* de aproximadamente 1470 pb. Este fragmento de ADN se mezcló con un fragmento obtenido digiriendo pl\*a\*z preparado en el Ejemplo 30 con una enzima de restricción BamHI, generando extremos romos usando la ADN polimerasa de T4 y desfosforilando los extremos usando fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron usando un ligasa. A continuación, las células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5α (Toyobo Co., Ltd. DNA-903) se transformaron con el producto de ligación, y se obtuvieron transformantes que crecieron en una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina a 30°C. Se recuperaron plásmidos de las células bacterianas obtenidas, y un plásmido que se confirmó que tenía una inserción adecuada de la *cscA* por unión entre el lado 3' terminal del gen de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (*zwf*) y el lado 5' terminal de la *cscA* se denominó pl\*a\*-z-cscA.

- 30 Aquí, el genoma de *Escherichia coli* O157 está disponible en el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (Institute for Reference Materials and Measurements).

- 35 Las células competentes de la variante de *Escherichia coli* B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR preparada en el Ejemplo 21 se transformaron con el plásmido pl\*a\*-z-cscA preparado anteriormente, y se cultivaron a 37 °C durante la noche en un caldo LB, placa de agar Miller que contenía 50 µg/ml de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo la variante de *Escherichia coli* pl\*a\*-z-cscA/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR.

**[Ejemplo de prueba 3]**

- 40 (Producción de alcohol isopropílico y acetona)

- 45 La producción de alcohol isopropílico y acetona se llevó a cabo de la misma manera que en el [Ejemplo de Ensayo 1] descrito anteriormente, excepto que se utilizó la variante de *Escherichia coli* pl\*a\*-z-cscA/B::atoDABΔpgiΔgndΔgntR y se usó una solución acuosa de sacarosa 40 % p/p como medio de cultivo en lugar de la solución acuosa de glucosa 50 % p/p. Como resultado, se observó la producción de 82,0 g/l de alcohol isopropílico y 23,7 g/l de acetona 72 horas después del inicio del cultivo. El análisis por HPLC del agua de trampa del primer tanque reveló que contenía 0,14 % en masa de acetona y 0,55 % en masa de alcohol isopropílico.

- 50 (Recuperación de alcohol isopropílico y acetona)

- Del agua de la trampa que contiene alcohol isopropílico y acetona, se recuperaron alcohol isopropílico y acetona a altas concentraciones por destilación.

- 55 Específicamente, se pasaron primero 9 l de la solución acuosa descrita anteriormente a través de una columna rellena con 250 ml de resina de intercambio catiónico (AMBERLYST 31 WET fabricada por Organo Corporation) a un caudal de 500 ml/h, eliminándose amoníaco residual etc. La solución resultante se destiló a presión normal. Se recogió una muestra de una fracción obtenida en puntos de ebullición de 53 a 81,6 °C y se analizó por GC, y se encontró que contenía 19,1 % en masa de acetona, 60,5 % en masa de alcohol isopropílico, 0,5 % en masa de componentes no identificados y el resto agua. La fracción se usó como materia prima para las reacciones de deshidrogenación en los siguientes Ejemplos 36 a 39, y para la producción de propileno en el Ejemplo 40.

60

**[Ejemplo 36]**

(Fabricación de acetona)

65

<Preparación del catalizador de deshidrogenación ZnO:ZrO<sub>2</sub> (94:6)>

Se añadieron 15,94 g (0,15 mol) de carbonato de sodio y 130 ml de agua a un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con paletas de agitación, para formar una solución. A la solución acuosa resultante, se añadió gota a gota durante una hora y media una solución acuosa obtenida disolviendo 34,36 g (0,11 mol) de nitrato de zinc hexahidratado y 1,30 g (0,05 mol) de óxido de dinitrato de zirconio dihidratado en 150 ml de agua. El resultante se dejó reposar durante 5 días, luego se filtró y se lavó bien con agua. La materia blanca resultante se secó a 120 °C durante 2 horas, y a 400 °C durante 1 hora, y, finalmente, se calcinó a 600 °C durante 2 horas. Se obtuvo como polvo blanco 9,50 g de un catalizador de óxido complejo, ZnO:ZrO<sub>2</sub> (94:6).

## &lt;Producción de acetona&gt;

Se añadió 1,0 g del catalizador de óxido complejo ZnO:ZrO<sub>2</sub> (94:6) (moldeado por compresión a 20 MPa y cuyo tamaño determinado posteriormente fue de 250 a 500 μm) a un reactor de SUS con un diámetro de 1 cm y una longitud de 40 cm, y el destilado obtenido anteriormente (acetona: 19,1 % en masa, alcohol isopropílico: 60,5 % en masa, componentes no identificados: 0,5 % en masa, el resto: agua) se dejó fluir a través del reactor a 350 °C a una velocidad de 1,50 g/hora bajo una corriente de nitrógeno de 10 ml/min. Se enfrió un puerto de salida del reactor, atrapando así la solución de reacción y el gas de reacción. La muestra de producto obtenida a las 5 horas después del inicio de la reacción se analizó mediante cromatografía de gases y, como resultado, se determinó que la acetona se producía a alta concentración como se muestra en la Tabla 8 incluso cuando se usaba una gran cantidad de agua y las impurezas de los organismos que contenían acetona y alcohol isopropílico. En la Tabla 8, "AIP" representa alcohol isopropílico (lo mismo se aplicará a continuación).

**[Ejemplo 37]**

Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo 36, excepto que la temperatura de reacción se ajustó a 400 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Como se muestra en la Tabla 8, se produjo acetona a alta concentración.

**[Ejemplo 38]**<Preparación del catalizador de deshidrogenación ZnO:ZrO<sub>2</sub> (88:12)>

Se añadieron 15,94 g (0,15 mol) de carbonato de sodio y 130 ml de agua a un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con paletas de agitación, para formar una solución. A la solución acuosa resultante, se añadió gota a gota durante una hora y media una solución acuosa obtenida disolviendo 32,86 g (0,11 mol) de nitrato de zinc hexahidratado y 2,66 g (0,10 mol) de óxido de dinitrato de zirconio dihidratado en 150 ml de agua. El resultante se dejó reposar durante 5 días, luego se filtró y se lavó bien con agua. La materia blanca resultante se secó a 120 °C durante 2 horas, y a 400 °C durante 1 hora, y, finalmente, se calcinó a 600 °C durante 2 horas. Se obtuvo como polvo blanco 9,94 g de un catalizador de óxido complejo, ZnO:ZrO<sub>2</sub> (88:12).

## &lt;Producción de acetona&gt;

Se añadió 1,0 g del catalizador de óxido complejo ZnO:ZrO<sub>2</sub> (88:12) (moldeado por compresión a 20 MPa y cuyo tamaño determinado posteriormente fue de 250 a 500 μm) a un reactor de SUS con un diámetro de 1 cm y una longitud de 40 cm, y el destilado obtenido anteriormente (acetona: 19,1 % en masa, alcohol isopropílico: 60,5 % en masa, componentes no identificados: 0,5 % en masa, el resto: agua) se dejó fluir a través del reactor a 350 °C a una velocidad de 1,50 g/h bajo una corriente de nitrógeno de 10 ml/min. Se enfrió un puerto de salida del reactor, atrapando así la solución de reacción y el gas de reacción. La muestra de producto obtenida a las 5 horas después del inicio de la reacción se analizó mediante cromatografía de gases y, como resultado, se encontró que la acetona se producía a alta concentración como se muestra en la Tabla 8.

**[Ejemplo 39]**

Se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo 38, excepto que la temperatura de reacción se ajustó a 400 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Como se muestra en la Tabla 8, se produjo acetona a alta concentración.

Tabla 8

	Catalizador	Temperatura de reacción	Relación de conversión de AIP (%)	Composición de productos (en términos de % en moles/AIP)				
				Acetona	Propileno	Óxido de mesitilo	Metil isobutil cetona	Otros
Ejemplo 36	ZnO : ZrO <sub>2</sub> (94:6)	350 °C	95,9	79,2	7,5	3,2	0,1	10,0
Ejemplo 37	ZnO : ZrO <sub>2</sub> (94:6)	400 °C	99,9	72,0	5,2	4,4	0,1	18,3
Ejemplo 38	ZnO : ZrO <sub>2</sub> (88:12)	350 °C	81,1	90,0	0,8	2,0	0,1	7,1
Ejemplo 39	ZnO : ZrO <sub>2</sub> (88:12)	400 °C	98,5	81,2	1,7	4,0	0,1	13,0

**[Ejemplo 40]**

## 5 (Producción de propileno)

Se llevó a cabo una reacción de flujo de fase líquida presurizada mediante un flujo descendente usando el destilado obtenido del líquido de cultivo descrito en el Ejemplo de Prueba 3 del Ejemplo 35 como materia prima y usando un reactor de lecho fijo equipado con una bomba de alimentación de alta presión, un flujo másico de hidrógeno a alta presión, un flujo másico de nitrógeno a alta presión, un horno eléctrico, un reactor que tiene una porción de llenado de catalizador y una válvula de contrapresión.

En primer lugar se cargó 1,0 g de polvo (clasificado de 250 a 500 µm) de un catalizador de cobre y zinc (fabricado por SudChemie, nombre del producto: SHIFTMAX 210, que tiene el siguiente porcentaje en masa de elementos: del 32 % al 35 % de Cu, del 35 % al 40 % de Zn, y del 6 % al 7 % de Al) como una capa de catalizador del lado aguas arriba en un reactor de SUS y que tiene un diámetro interno de 1 cm, desde el lado de salida del reactor. Después de cargar en el reactor lana de cuarzo para separar las capas de catalizador, se cargó en el reactor 1,0 g de β-zeolita (fabricada por Catalysts & Chemicals Industries Co., Ltd., preparada por moldeo por compresión a 20 MPa y clasificación posterior en 250 a 500 µm) como una capa de catalizador aguas abajo.

Después de presurizar el reactor a 2,5 MPa con hidrógeno, el destilado descrito anteriormente (acetona: 19,1 % en masa, alcohol isopropílico: 60,5 % en masa, componentes no identificados: 0,5 % en masa, el resto: agua) se dejó fluir desde la lado de entrada del reactor a 180 °C a una velocidad de 0,60 g/h bajo una corriente de hidrógeno de 20 ml/min desde el lado de entrada del reactor. Se introdujo nitrógeno, a 200 ml/min, entre la salida del reactor y la válvula de contrapresión, utilizando el flujo másico de nitrógeno a alta presión. Se instaló un tubo de separación gas-líquido en una línea justo aguas abajo de la válvula de contrapresión, y el componente gaseoso y el componente líquido recogidos se analizaron individualmente por GC para cuantificar los productos. Los resultados de la reacción se muestran en la Tabla 9. Como se muestra en la Tabla 9, se determinó que el propileno se producía a una alta relación de conversión incluso en un caso en el que se usaba una gran cantidad de agua e impurezas de organismos que contenían acetona y alcohol isopropílico. En la Tabla 9, "DIPE" representa diisopropil éter.

Tabla 9

Tiempo de reacción	Proporción residual / (Acetona + AIP)		Composición de los productos (en términos de % en moles / AIP)				
	Acetona	AIP	Propileno	Propano	Dímero de propileno	DIPE	Otros
10	1,0	1,2	98,1	0,3	0,1	1,0	0,5

**Listado de secuencias**

35 <110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> Bacteria productora de alcohol isopropílico que tiene una productividad mejorada

40 <130> MT-F03094-00

<140> PCT/JP2011/068402

<141> 11-08-2011

45 <150> JP2010-181150

<151> 12-08-2010

<150> JP2011-049531  
 <151> 07-03-2011  
  
 <160> 49  
 5  
 <170> PatentIn versión 3.5  
  
 <210> 1  
 <211> 30  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 15  
 <400> 1  
 cgctcaattg caatgattga cacgattcog 30  
  
 <210> 2  
 <211> 32  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 25  
 <400> 2  
 acagaattcg ctattgta gtgaataaaa gg 32  
  
 <210> 3  
 <211> 50  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 35  
 <400> 3  
 cgaattcgcct ggtggaacat atgaaaacaa aattgatgac attacaagac 50  
 40  
 <210> 4  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 4  
 50 ggggtacctt attgctctc ctgtgaaacg 30  
  
 <210> 5  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 5  
 60 gctctagatg ctgaaatcca ctagtctgt c 31  
  
 <210> 6  
 <211> 29

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador  
  
 <400> 6  
 tactgcagcg ttccagcacc ttatcaacc 29  
  
 10 <210> 7  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 7  
 20 ggtctagagc aatgattgac acgattcgg 29  
  
 <210> 8  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 8  
 30 aatagcatg ctggtggaac atagaaagg tttgcaatg ctagg 45  
  
 <210> 9  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 40 <400> 9  
 ggggatcctt ataataaac tactgctta attaagtc 38  
  
 <210> 10  
 <211> 54  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 10  
 caggatccgc tggggaaca tatgttaaag gatgaagtaa taaacaaat tagc 54  
  
 <210> 11  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> cebador  
 60 <400> 11  
 ggaattcggg accttactta agataatcat atataacttc agc 43

ES 2 668 457 T3

5  
<210> 12  
<211> 46  
<212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
  
<400> 12  
10 caggatcccg gagaaagtct tatggcggta acgcaaacag cccagg 46  
  
<210> 13  
<211> 34  
<212> ADN  
15 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
  
20 <400> 13  
cgtctagatt actcaaactc attccaggaa cgac 34  
  
<210> 14  
<211> 29  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
  
30 <400> 14  
caggaattcg ctatatctgg ctctgcacg 29  
  
<210> 15  
<211> 31  
35 <212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
  
40 <400> 15  
cagtctagag caatactctt ctgatttga g 31  
  
<210> 16  
<211> 29  
45 <212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
  
50 <400> 16  
cagtctagat catcgtcgat atgtaggcc 29  
  
<210> 17  
<211> 29  
55 <212> ADN  
<213> Artificial  
  
60 <220>  
<223> cebador

ES 2 668 457 T3

<400> 17  
 gacctgcaga tcacccgtca gctgtacgc 29  
  
 5 <210> 18  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 10 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 18  
 ogagctacat atgcaatgat tgacaagatt cag 33  
  
 15 <210> 19  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 19  
 cgcgcgcatg ctatttgta tgaataaaa gg 32  
  
 25 <210> 20  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 20  
 aatatgcatg ctggggaac atatgaaagg tttgcaatg ctagg 45  
  
 35 <210> 21  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 21  
 gggatcgg tacctataa tataactact gcttaatta agtc 44  
  
 45 <210> 22  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 50 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 22  
 atggatcgc tggggaaca taigaaaat tggatcatg tcag 44  
  
 55 <210> 23  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 60 <220>  
 <223> cebador  
  
 65 <220>  
 <223> cebador

<400> 23  
 gcagaagctt gtctagatta attcaaccgt tcaatcacca tc 42  
 5  
 <210> 24  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 24  
 gctctagagc tggggaaca tatgaaaaca aaattgatga cattacaaga c 51  
 15  
 <210> 25  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 25  
 tagcaagctt ctactcgagt tattgctct cctgtgaaac g 41  
 25  
 <210> 26  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 26  
 aagtctcgag ctggtggaac atatggatgc gaaacaacgt attg 44  
 35  
 <210> 27  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 27  
 ggccaagctt cataaatcac cccgttgc 28  
 45  
 <210> 28  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 28  
 caggtagccg tggggaaca tatgttaaag gatgaagtaa taaacaaat tagc 54  
 55  
 <210> 29  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> cebador  
 65

<400> 29  
 gggatcctt acttaagata atcatatata acttcagc 38

5 <210> 30  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 30  
 ggaattcggg tcaattttca ccctctatc 29

15 <210> 31  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> cebador

<400> 31  
 gtgggccgtc ctgaaggtag aaaagagata gattctc 37

25 <210> 32  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> cebador

<400> 32  
 ctcttttga ccttcaggac ggcccacaaa ttgaag 37

35 <210> 33  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> cebador

<400> 33  
 ggaattccca gcccgcgaag gccgatggc 29

45 <210> 34  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> cebador

<400> 34  
 cgccatatga atggcgcggc ggggcccgtg g 31

55 <210> 35  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> cebador

65 <220>  
 <223> cebador

<400> 35  
 tggagctctg tttactcctg tcaggggg 28

5 <210> 36  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 36  
 tggagctctc tgatttaac aacaataaaa ftg 33

15 <210> 37  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> cebador

<400> 37  
 cgggatccac caccataacc aaacgacgg 29

25 <210> 38  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> cebador38

<400> 38  
 cgagctacat atgcaatgat tgacacgatt ccg 33

35 <210> 39  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> cebador39

45 <400> 39  
 cgcgcatg ctattgta gtgaataaaa gg 32

50 <210> 40  
 <211> 1056  
 <212> ADN  
 <213> *Clostridium beijerinckii*

<400> 40

**atgaaagggtt ttgcaatgct gggatattaat aagctgggct ggatcgaaaa agagcgcccc 60**

**gttgcggggtt cgtatgatgc gattgtgcgc cactggccg tatctccgtg tacctcagat 120**

**atccataccg tttttgaggg agctcttggc gaccgcaaga atatgatttt agggcatgaa 180**

**gcgggtgggtg aagttgtgga ggtaggcagt gaagtgaagg atttcaaacc tggtgaccgt 240**

55

ES 2 668 457 T3

**gttatcgtcc cttgcacaac cccggattgg cggctcttgg aagttcaggc tggttttcaa 300**  
**cagcaactcaa acggtatgct cgcaggatgg aaattttcca acttcaagga tggcgtcttt 360**  
**ggtgagtatt ttcattgtgaa tgatgcgat atgaatcttg cgattctgcc taaagacatg 420**  
**cccctggaaa acgctgttat gatcacagat atgatgacta cgggcttcca cggagccgaa 480**  
**cttgcagata ttcagatggg ttcaagtgta gtggtcattg gcattggcgc ggttggcctg 540**  
**atggggatag ccggtgctaa attacgtgga gcaggtcgga tcattggcgt ggggagccgc 600**  
**ccgattttgtg tcgaggctgc caaattttac ggggccaccg acattttgaa ttataaaaat 660**  
**ggtcatatcg ttgatcaagt catgaaactg acgaacggaa aaggcgttga ccgctgatt 720**  
**atggcaggcg gtggtagcga aacactgtcc caggccgtat ctatggtcaa accaggcggg 780**  
**atcatttcga atataaatta tcatggaagt ggcgatgcgt tattgatccc gcgtgtggaa 840**  
**tgggggtgcg gaatggctca caagactatc aaagggcgtc tttgtcccgg gggacgtttg 900**  
**agagcagaga tgctgcgaga tatggtagtg tacaaccgtg ttgatctcag caaactggtc 960**  
**acgcatgtat atcatgggtt cgatcacatc gaagaagccc tgttactgat gaaagacaag 1020**  
**ccaaaagacc tgattaaagc agtagttata ttataa 1056**

5 <210> 41  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cebador41

<400> 41  
 acatgcatgc atgaaagggtt ttgcaatgct g 31

15 <210> 42  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> cebador42

<400> 42  
 acgctgcgac ttataatata actactgctt taa 33

25 <210> 43  
 <211> 735  
 <212> ADN  
 <213> *Clostridium acetobutylicum*

30 <400> 43

ES 2 668 457 T3

**atgctgaaag atgaagtgat taaacagatt agcaacgccat taacttcgcc tgcatttccg 60**  
**cgcggtccgt ataaatttca taatcgtgaa tattttaaca ttgtataccg taccgatatg 120**  
**gacgccctgc gtaaagttgt gccagagcct ctggaaattg atgagccctt agtccggttc 180**  
**gaaatcatgg caatgcatga tacgagtggc ctgggttgct atacagaatc aggtcaggct 240**  
**attcccgtga gctttaatgg tgtaagggc gactaccttc acatgatgta tctggataac 300**  
**gagccggcaa ttgccgtagg tcgggaatta agtgcatacc ctaaaaagct cgggtatcca 360**  
**aagctgtttg tggattcaga cactctggtg ggcacgtag actatggaaa actgcgtgtt 420**  
**gcgaccgcga caatggggta caaacataaa gccctggatg ctaatgaagc aaaggatcaa 480**  
**atttgtcgcc cgaactatat gttgaaaatc atcccccaatt atgacggctc cctcgcata 540**  
**tgcgagctta tcaacgcgaa aatcaccgat gttaccgtac atgaagcttg gacaggaccg 600**  
**actcgactgc agttattoga tcacgctatg gcgccactga atgacttgcc ggtcaaagag 660**  
**attgtttcta gctctcacat tcttgccgat ataatcttgc cgcgcgcgga agtcatatac 720**  
**gattatctca agtaa 735**

5 <210> 44  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 10 <220>  
 <223> cebador44  
  
 <400> 44  
 acgctcgac gctggtggg ggaacatag ctgaaagatg aagtgatta 49  
  
 15 <210> 45  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> cebador45  
  
 <400> 45  
 gctctagatt actgagata atcgtatatg a 31  
  
 25 <210> 46  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> cebador46  
  
 <400> 46  
 gctctagacg gagaaagtct tatggcggta acgcaaacag cccagg 46  
  
 35 <210> 47  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 40

ES 2 668 457 T3

<220>  
<223> cebador47

5 <400> 47  
cgggatcctt actcaaacctc attccaggaa cgac 34

10 <210> 48  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> cebador48

20 <400> 48  
gctggtgaa catatgacgc aatctcgatt gcatg 35

25 <210> 49  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador49

<400> 49  
ttaaccagtg tgccagagtg c 21

## REIVINDICACIONES

1. Una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que comprende un sistema de producción de alcohol isopropílico, en el que se inactiva una actividad del represor transcripcional GntR para mejorar la eficacia de la producción de alcohol isopropílico y la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico comprende un grupo de enzimas auxiliares que tienen un patrón de expresión de la actividad enzimática con el que se mantiene o aumenta la capacidad de producción de alcohol isopropílico conseguida mediante la inactivación de la actividad GntR, en el que el patrón de expresión de la actividad enzimática del grupo de enzimas auxiliares se selecciona del grupo que consiste en:
- (1) mantenimiento de las actividades de tipo silvestre de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi), la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) y la actividad fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd);
  - (2) inactivación de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi) y aumento de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf); e
  - (3) inactivación de la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi), aumento de la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) e inactivación de la actividad fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd), y
- en la que el sistema de producción de alcohol isopropílico está constituido por genes de las enzimas acetoacetato descarboxilasa, alcohol isopropílico deshidrogenasa, CoA transferasa y tiolasa.
2. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la actividad glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf) es una actividad de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa codificada por un gen de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa de una bacteria del género *Escherichia*.
3. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que:
- (a) el gen de la enzima acetoacetato descarboxilasa es un gen de la acetoacetato descarboxilasa de un procarionte seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*,
  - (b) el gen de la enzima alcohol isopropílico deshidrogenasa es un gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa de un procarionte seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*,
  - (c) el gen de la enzima de la CoA transferasa es un gen de la CoA transferasa de un procarionte seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*, y
  - (d) el gen de la enzima tiolasa es un gen de la tiolasa de un procarionte seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*.
4. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en la que:
- (a) la actividad acetoacetato descarboxilasa es una actividad de acetoacetato descarboxilasa codificada por un gen que codifica la acetoacetato descarboxilasa de *Clostridium acetobutylicum*,
  - (b) la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa es una actividad de alcohol isopropílico deshidrogenasa codificada por un gen que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa de *Clostridium beijerinckii*,
  - (c) la actividad CoA transferasa es una actividad de CoA transferasa codificada por un gen que codifica la CoA transferasa de *Escherichia coli*, y
  - (d) la actividad tiolasa es una actividad de tiolasa codificada por un gen que codifica la tiolasa de *Escherichia coli*.
5. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la reivindicación 1, en la que:
- (a) la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa es una actividad de alcohol isopropílico deshidrogenasa codificada por un gen que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa introducido como un gen modificado, y/o
  - (b) la actividad acetoacetato descarboxilasa es una actividad de acetoacetato descarboxilasa codificada por un gen que codifica la acetoacetato descarboxilasa introducido como un gen modificado.
6. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el gen modificado de la alcohol isopropílico deshidrogenasa tiene una secuencia de bases de SEQ ID NO: 40, y el gen modificado de la acetoacetato descarboxilasa tiene una secuencia de bases de SEQ ID NO: 43.
7. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, que comprende además al menos un gen de sacarosa hidrolasa de entre genes de sacarosa no PTS.
8. Un método de producción de alcohol isopropílico, que comprende la producción de alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un método para producir acetona, que comprende:

- 5 obtener alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y  
poner en contacto el alcohol isopropílico obtenido con un óxido complejo como catalizador que incluye óxido de zinc y al menos un óxido que contiene un elemento del Grupo 4, y que se prepara por coprecipitación.

10. Un método para producir propileno, que comprende:

- 10 obtener alcohol isopropílico que contiene acetona a partir de una materia prima procedente de plantas utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y  
poner en contacto el alcohol isopropílico con una sustancia ácida sólida y un catalizador de hidrogenación que contiene Cu como catalizadores, a una temperatura de reacción dentro de un intervalo de 50 a 300 °C.
- 15 11. El método para producir propileno de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el catalizador de hidrogenación que contiene Cu es un catalizador que incluye además al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en elementos del Grupo 6, Grupo 12 y Grupo 13.
- 20 12. El método para producir propileno de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que la sustancia ácida sólida es zeolita.