

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 206**

51 Int. Cl.:

C12P 7/42

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2007 PCT/EP2007/055625**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2007 WO07141316**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2007 E 07729987 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2027277**

54 Título: **Producción de ácido glicólico mediante fermentación a partir de recursos renovables**

30 Prioridad:

09.06.2006 WO PCT/EP2006/063046

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

26.11.2018

73 Titular/es:

**METABOLIC EXPLORER (100.0%)
Biopole Clermont-Limagne
63360 Saint Beuzire, FR**

72 Inventor/es:

SOUCAILLE, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 691 206 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

Producción de ácido glicólico mediante fermentación a partir de recursos renovables.

5 **Campo de la invención**

La invención comprende un procedimiento para la bioconversión a ácido glicólico, de una fuente de carbono fermentable, por un microorganismo desarrollado de manera aeróbica.

10 **Antecedentes de la invención**

El ácido glicólico (HOCH₂COOH) es el primer miembro de la familia de ácidos alfa-hidroxi, de ácidos carboxílicos. El ácido glicólico presenta una doble funcionalidad tanto con alcohol como con grupos funcionales ácidos moderadamente fuertes, en una molécula muy pequeña. Esto logra atributos químicos de carácter único así como una química típica ácida y alcohólica.

El ácido glicólico utiliza tanto los grupos hidroxilo como los grupos ácido carboxílico para formar complejos de anillo de cinco miembros (quelatos) con metales polivalentes. Esta capacidad de acomplejamiento de iones metálicos es útil en la disolución de escala de agua dura y en la prevención de depósito, en especial, en aplicaciones de limpieza ácida en las que la buena capacidad de enjuague es un factor clave. El ácido glicólico pasa por reacciones con ácidos y alcoholes orgánicos para formar ésteres. Los ésteres glicólicos de alquilo de bajo peso molecular presentan unas propiedades de solvencia inusuales, y pueden utilizarse como un reemplazo para n- e iso-propanol, etilendiamina, fenol, m-cresol, acetato de 2-etoxietilo y lactato de etilo y metilo. Los ésteres de alquilo de peso molecular más alto pueden utilizarse en formulaciones de productos para el cuidado personal. El ácido glicólico puede reaccionar con sí mismo para formar dímero de glicólido, oligómeros de poliéster de cabeza a cola y polímeros de cadena larga. Pueden prepararse copolímeros con otros alfa hidroxiaácidos tales como ácido láctico. Los polímeros de poliésteres se hidrolizan gradualmente en entornos acuosos, a velocidades controlables. Esta propiedad los hace útiles en aplicaciones biomédicas, tales como suturas solubles, y en aplicaciones en las que se necesita la liberación controlada de ácido, para reducir el pH. En la actualidad, se consumen anualmente más de aproximadamente 14000000 kg (15000 toneladas) de ácido glicólico en los Estados Unidos.

Son divulgados en la técnica unos procedimientos para la conversión enzimática de un sustrato en ácido glicólico. Todos estos procedimientos comprenden preparar una enzima cultivando un microorganismo y utilizar a continuación la enzima que es producida, posiblemente con la célula de microorganismo completa, para convertir un sustrato de complejo en un medio de reacción. El sustrato de complejo puede ser glicolonitrilo, convertido en glicolato mediante una nitrilasa (documento WO 02/068658; documento JP 09 028390). El sustrato de complejo puede ser un ácido 2-oxo-carboxílico convertido estereoespecíficamente en el ácido (R)-2-hidroxi carboxílico con la combinación de dos enzimas, YiaE y una glucosa deshidrogenasa (Yun & al., *Biotechnology Progress*, vol. 21, nº 2, 2005, 366-371). El sustrato puede ser etilenglicol, convertido en glicolato mediante lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa (documento WO-A-2005106005). Para la producción biológica de ácido glicólico, presentada en la figura 1, se requiere la formación de glioxilato como un producto intermedio, que es reducido a glicolato por una oxidoreductasa dependiente de NADPH (nicotinamida adenosina dinucleótido fosfato), codificada por el gen *ycdW* (Nunez y col. (2001): *Biochemistry*; 354; 707-715). El glioxilato es un producto intermedio del ciclo de glioxilato (ciclo de ácido tricarbóxico y derivación de glioxilato, reseñado por Neidhardt, F. C. (Director de Ed.); R. Curtiss III; J. L. Ingraham; E. C. C. Lin; K. B. Low; B. Magasanik; W. S. Reznikoff; M. Riley; M. Schaechter; y H. E. Umbarger (eds.); 1996: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology). En este ciclo, el isocitrato es disociado en succinato y glioxilato, una reacción que es catalizada por isocitrato liasa, codificada por el gen *AceA*. El succinato entra directamente en el ciclo de ácido cítrico, y es convertido en oxaloacetato. El glioxilato se convierte en malato, mediante la incorporación de una molécula de acetil-CoA derivada de acetato, una reacción catalizada por las dos isoenzimas malato sintasas codificadas por *aceB* y *gcB*. La entrada de carbono en la desviación de glioxilato es regulada en el nivel de transcripción y postranscripción. La regulación transcripcional es ejercida sobre el operón *aceBAK* por el represor IclR. *AceBAK* codifica malato sintasa, isocitrato liasa e isocitrato cinasa/fosfatasa, respectivamente. El gen *icR* es autorregulado de manera negativa y activado por la proteína FadR. La actividad de isocitrato deshidrogenasa, codificada por el gen *icd*, es regulada en forma postranscripción. La isocitrato deshidrogenasa y la isocitrato liasa compiten por el sustrato común isocitrato. Debido a que el valor K_m para isocitrato es significativamente superior para la reacción de isocitrato liasa, la entrada en la vía de glioxilato depende, en parte, de la regulación de la enzima isocitrato deshidrogenasa. La actividad de isocitrato deshidrogenasa es modulada por su fosforilación o defosforilación catalizada por *AceK*. La fosforilación reduce la actividad de Icd, y la defosforilación reactiva la enzima Icd. La acción de *AceK* como cinasa o fosfatasa depende de la presencia de varios metabolitos. La reducción de isocitrato y 3-fosfoglicerato estimula la actividad de cinasa; la presencia de piruvato y AMP inhibe la función de cinasa, para favorecer de ese modo la actividad de fosfatasa (ver, además, Neidhardt). El

glioxilato puede ser convertido en tartronato semialdehído por una glioxilato carboligasa codificada por *gcl*, y en 2-ceto-4-hidroxi glutarato, por una 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa, codificada por *eda*; mientras que el glicolato puede ser reducido a glicolaldehído por una glicolaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (nicotinamida adenosina dinucleótido) codificada por *aldA*, u oxidado a glioxilato por una glicolato oxidasa dependiente de NAD⁺ codificada por *glcDEF*.

El problema que la presente invención debe resolver es la producción biológica de ácido glicólico a partir de un sustrato de carbono económico, tal como glucosa u otros azúcares. La cantidad de etapas bioquímicas y la complejidad de las vías metabólicas requieren, para un procedimiento industrial factible para la producción de ácido glicólico, el uso de un catalizador de célula entera metabólicamente diseñado.

Sumario de la invención

En el contexto de la presente invención se ha resuelto el problema planteado y la presente invención proporciona un procedimiento para la bioconversión de una fuente de carbono fermentable apta para ser metabolizada por un microorganismo recombinante modificado para convertir directamente dicha fuente de carbono en ácido glicólico. El microorganismo es modificado para atenuar la conversión de glioxilato en productos diferentes a glicolato, con la atenuación de la expresión de por lo menos un gen, seleccionado de entre los genes siguientes implicados en el metabolismo de glioxilato:

aceB que codifica la malato sintasa,
glcB que codifica la segunda malato sintasa,
gcl que codifica la glioxilato carboligasa,
eda que codifica la 2-ceto-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa.

La fuente de carbono fermentable es un azúcar seleccionado de entre monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. El procedimiento de la invención comprende las etapas siguientes:

- a) fermentar el microorganismo para producir ácido glicólico convirtiendo la fuente de carbono en ácido glicólico,
- b) concentrar el ácido glicólico en las bacterias o en el medio y
- c) recuperar el ácido glicólico del caldo de fermentación y/o la biomasa que permanece opcionalmente en partes o en la cantidad total (0-100%) del producto final. Se utiliza la glucosa como un modelo de sustrato y se utiliza *E. coli* recombinante como el hospedador modelo. En un aspecto de la presente invención, se construyen *E. coli* recombinantes, que no pueden metabolizar glioxilato en otros compuestos diferentes de glicolato, mediante la inactivación de los genes que *aceB'*, *glcB'*, *gcl* y *eda*. En otro aspecto de la presente invención, se usa una actividad de glioxilato reductasa dependiente de NADPH, para reducir el glioxilato tóxico en glicolato, utilizando unos genes codificantes endógenos como *ycdW* o *yiaE*. En un aspecto adicional de la presente invención el gen que codifica las enzimas metabolizadoras de glicolato, glicolato oxidasa (*glcDEF*) y glicolaldehído deshidrogenasa (*aldA*), es eliminado. Además, el flujo en la vía de glioxilato es incrementada por i) el aumento del nivel de *AceA*, mediante la inactivación del gen *iclR*, o directamente, el aumento de la expresión de *aceA*; ii) la disminución del nivel de expresión o la inactivación del gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa (*icd*); e iii) la inactivación de los genes que codifican la piruvato oxidasa (*poxB*) y la vía de acetato (*ack*, *pta*). En un aspecto final de la presente invención, se obtiene un mejor rendimiento de la producción de glicolato, por medio de la mayor disponibilidad de NADPH, mediante la inactivación de los genes que codifican la glucosa-6-fosfato isomerasa (*pgi*), la 6-fosfogluconato deshidratasa (*edd*) y la transhidrogenasa soluble (*udhA*). La presente invención puede aplicarse, en general, para incluir cualquier sustrato de carbono que sea convertido sin dificultad en acetyl-coA.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un organismo recombinado, útil para la producción de ácido glicólico, que comprende: (a) por lo menos la inactivación de todos los genes codificadores de malato sintasas, glioxilato carboligasas y 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa; (b) por lo menos un gen que codifica un polipéptido que presenta una actividad de glioxilato reductasa dependiente de NADPH; y (c) por lo menos la inactivación de los genes que codifican la oxidación de glicolato dependiente de NAD⁺ a glioxilato. Opcionalmente, el organismo recombinado puede comprender: i) mutaciones de inactivación en genes endógenos seleccionados de entre el grupo que consiste en: (a) un gen que codifica un represor de la vía de glioxilato; (b) un gen que codifica un polipéptido que presenta una actividad de glucosa-6-fosfato isomerasa; (c) un gen que codifica un polipéptido que presenta una actividad de transhidrogenasa soluble; (d) un gen que codifica un polipéptido que presenta una actividad de 6-fosfogluconato deshidratasa; (e) genes que codifican polipéptidos que presentan unas actividades de fosfo-transacetilasa y acetato cinasa; (f) un gen que codifica la actividad de piruvato oxidasa; (g) un gen que codifica

la actividad de glicolaldehído deshidrogenasa; ii) mayor nivel de un gen que codifica la isocitrato liasa; y iii) menor nivel, o inactivación, de un gen que codifica un polipéptido que presenta una actividad de isocitrato deshidrogenasa.

5 En otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para la producción de ácido glicólico a partir de un organismo recombinado, que comprende: (a) el contacto del organismo recombinado de la presente invención, con por lo menos una fuente de carbono seleccionada de entre el grupo que consiste en monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y sustratos de carbono simple, con lo cual se produce glicolato; opcionalmente, (b) la recuperación del ácido glicólico producido en la etapa (a), a una etapa de polimerización hasta por lo menos dímeros de ácido glicólico; y (c) la recuperación de ácido glicólico mediante la despolimerización a partir de dímeros, oligómeros y polímeros de ácido glicólico.

Breve descripción de los dibujos

15 Los dibujos adjuntos, que se incorporan a la memoria y forman parte de la misma, ejemplifican la invención, y junto con la descripción, tienen la función de explicar los principios de la presente invención.

La figura 1 representa el diseño genético de la glicólisis, el ciclo de TCA (ácido tricarbóxico) y la vía de glioxilato en el desarrollo del sistema de producción de ácido glicólico a partir de carbohidratos.

20 La figura 2 es un diagrama que muestra la construcción del vector pME101-ycdW.

Descripción detallada de la invención

25 De acuerdo con la presente solicitud, pueden usarse los siguientes términos para la interpretación de las reivindicaciones y de la memoria.

El término “cepa mutante” se refiere a una cepa no natural.

30 El término “microorganismo” se refiere a toda clase de organismos unicelulares, entre ellos, organismos procariotas como bacterias, y organismos eucariotas, como levaduras. Las bacterias incluyen en particular: *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* y *Corynebacteriaceae*. La *Enterobacteriaceae* comprende en particular pero no exclusivamente los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Pantoea*.

35 El término “transformación” o “transfección” se refiere a la adquisición de nuevos genes en una célula, tras la incorporación de ácido nucleico exógeno. El término “transformante” se refiere al producto de una transformación. El término “genéticamente alterado” se refiere al procedimiento de cambio de material hereditario mediante la transformación o mutación.

40 El término “atenuación” se refiere a la menor expresión de un gen, o a la menor actividad de la proteína, producto del gen. El experto en la materia conoce numerosos medios para obtener este resultado; por ejemplo:

- la introducción de una mutación en el gen, para disminuir el nivel de expresión de este gen, o el nivel de actividad de la proteína codificada;
- 45 - el reemplazo del promotor natural del gen por un promotor de baja fuerza, para lograr menor expresión;
- el uso de elementos desestabilizadores del correspondiente ARN mensajero o de la proteína;
- la eliminación del gen, si no es necesaria la expresión.

50 El término “expresión” se refiere a la transcripción y traducción de un gen a la proteína, producto del gen.

55 El término “plásmido” o “vector”, de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a un elemento cromosómico adicional que a menudo porta genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y habitualmente, en forma de molécula de ADN de doble hebra circular.

60 El término “sustrato de carbono” o “fuente de carbono” significa cualquier fuente de carbono apta para ser metabolizada por un microorganismo, en el que el sustrato contiene por lo menos un átomo de carbono. Los autores se refieren en particular a fuentes de carbono renovables, económicas y fermentables tal como monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, sustratos de un sólo carbono, y polioles tal como glicerol. El sustrato de un sólo carbono se define como moléculas de carbono que contienen únicamente un átomo de carbono tal como metanol.

- 5 Los monosacáridos de la fórmula $(\text{CH}_2\text{O})_n$ también se denominan osas u “azúcares simples”; los monosacáridos incluyen sacarosa, fructosa, glucosa, galactosa y manosa. Otras fuentes de carbono que comprenden más de un monosacárido se denominan disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los disacáridos incluyen sacarosa (sucrosa), lactosa y maltosa. El almidón y hemicelulosa son polisacáridos, también conocidos como “azúcares complejos”: Por lo tanto el término “fuente de carbono” hace referencia a cualquier producto como se mencionó anteriormente y las mezclas de los mismos.
- 10 El término “ATCC” representa la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852, U. S. A.
- Los términos “glioxilato” y “ácido glioxílico” se usan de modo indistinto.
- Los términos “glicolato” y “ácido glicólico” se usan indistintamente.
- 15 En la descripción de la presente invención, las enzimas se identifican por sus actividades específicas. Esta definición, por lo tanto, incluye todos los polipéptidos que presentan la actividad específica definida, también presente en otros organismos, más en particular, en otros microorganismos. A menudo, las enzimas con actividades similares pueden ser identificadas por su agrupación en ciertas familias definidas como PFAM o COG.
- 20 La PFAM (base de datos de familias de proteínas de alineaciones y modelos Markov escondidos; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>) representa una gran colección de alineaciones de secuencias de proteínas. Cada PFAM hace posible la visualización de múltiples alineaciones, la observación de dominios de proteína, la evaluación de la distribución entre organismos, el acceso a otras bases de datos, y la visualización de estructuras de proteínas conocidas.
- 25 Los COG (racimos de grupos de ortólogos de proteínas; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen mediante la comparación de secuencias de proteínas de 43 genomas completamente secuenciados que representan 30 líneas filogénicas principales. Cada COG se define a partir de por lo menos tres líneas, lo que permite la identificación de dominios conservados anteriores.
- 30 Los medios para la identificación de secuencias homólogas y sus porcentajes de homología son bien conocidos por el experto en la materia, y comprenden, en particular, los programas BLAST, que pueden usarse desde el sitio de Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, con los parámetros por defecto indicados en dicho sitio de Internet. Las secuencias obtenidas a continuación pueden ser explotadas (por ejemplo, alineadas), usando, entre otros, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) o MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), con los parámetros por defecto indicados en dichos sitios de Internet.
- 35 Usando las referencias proporcionadas en GenBank para genes conocidos, los expertos en la materia pueden determinar los genes equivalentes en otros organismos, en cepas bacterianas, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, etc. Este trabajo de rutina se realiza de modo conveniente utilizando secuencias de consenso que pueden ser determinadas efectuando alineaciones de secuencias con genes derivados de otros microorganismos, y diseñando sondas de degeneración para clonar el gen correspondiente en otro organismo. Estos métodos de rutina de biología molecular son bien conocidos por el experto en la materia, y se describen, por ejemplo, en la referencia de Sambrook et al. (1989 *Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York).
- 40 La presente invención proporciona un método para la producción de ácido glicólico, sus derivados o precursores, por fermentación, mediante el cultivo de un microorganismo en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, y la recuperación de ácido glicólico desde el medio de cultivo.
- 50 Una forma de realización adicional de la invención proporciona un método en el que el microorganismo es modificado de manera que presenta una baja capacidad de conversión de glioxilato, excepto para producir glicolato, debido a la atenuación de genes que codifican enzimas que consumen glioxilato, un precursor clave de glicolato: genes *aceB* y *gcB*, que codifican malato sintasas, *gcl*, que codifica glioxilato carboligasa, y *eda*, que codifica 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa.
- 55 En otra forma de realización de la invención, el microorganismo contiene por lo menos un gen que codifica un polipéptido que cataliza la conversión de glioxilato en glicolato.
- 60 En particular, se presenta un gen que codifica una enzima glioxilato reductasa dependiente de NADPH, para convertir, en condiciones aeróbicas, el producto intermedio glioxilato tóxico en el producto final de baja toxicidad,

glicolato. El gen puede ser exógeno o endógeno, y puede ser expresado en forma cromosómica o extracromosómica. Un gen que codifica glioxilato reductasa dependiente de NADPH puede tomarse de entre los genes *ycdW* o *yiaE* del genoma de *E. coli* MG1655. En una forma de realización preferida, la expresión de por lo menos uno de dichos genes es mayor. Si es necesario, puede obtenerse un alto nivel de actividad de glioxilato reductasa dependiente de NADPH, a partir de genes ubicados cromosómicamente, utilizando una o varias copias sobre el genoma, que pueden introducirse por medio de métodos de recombinación conocidos por el experto en la materia. Para genes extracromosómicos, pueden usarse diferentes tipos de plásmidos que difieren con respecto a su origen de replicación, y en consecuencia, con respecto a su número de copias en la célula. Estos pueden presentarse como 1-5 copias, ca. 20 o hasta 500 copias que corresponden a plásmidos de bajo número de copias con ajustada replicación (pSC101, RK2), plásmidos de bajo número de copias (pACYC, pRSF1010) o plásmidos de alto número de copias (pSK bluescript II). Los genes *ycdW* o *yiaE* pueden ser expresados usando promotores con diferente fuerza, que deben ser inducidos o no, por moléculas inductoras. Los ejemplos son los promotores P_{trc}, P_{tac}, P_{lac} y el promotor lambda cl u otros promotores conocidos por el experto en la materia. La expresión de los genes además puede ser reforzada por elementos que estabilizan el ARN mensajero correspondiente (Carrier y Keasling (1998): *Biotechnol. Prog.*; 15; 58-64) o la proteína (por ejemplo, marcas GST, Amersham Biosciences).

En una forma de realización adicional de la invención, el microorganismo es modificado de manera que no puede metabolizar sustancialmente el glicolato. Este resultado puede lograrse mediante la atenuación de por lo menos uno de los genes que codifican enzimas que consumen glicolato (*glcDEF*, que codifica glicolato oxidasa, y *aldA*, que codifica glicolaldehído deshidrogenasa). La atenuación de genes puede llevarse a cabo por medio del reemplazo del promotor natural por un promotor de baja fuerza, o por un elemento desestabilizador del correspondiente ARN mensajero o de la proteína. Si es necesario, puede lograrse además la atenuación completa del gen, mediante una eliminación de la correspondiente secuencia de ADN.

En otra forma de realización, el microorganismo utilizado en el método de la invención es transformado para incrementar el flujo de la vía de glioxilato.

El flujo en la vía de glioxilato puede aumentarse por diferentes medios, y en particular:

- i) disminuyendo la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa (*lcd*);
- ii) disminuyendo la actividad de por lo menos una de las siguientes enzimas:
 - fosfo-transacetilasa, codificada por el gen *pta*
 - acetato cinasa, codificada por el gen *ack*
 - piruvato oxidasa, codificada por el gen *poxB*
 - mediante la atenuación de los genes;
- iii) aumentando la actividad de la enzima isocitrato liasa, codificada por el gen *aceA*.

La disminución del nivel de isocitrato deshidrogenasa puede efectuarse mediante la introducción de promotores artificiales que conducen la expresión del gen *lcd*, que codifica la isocitrato deshidrogenasa; o por medio de la introducción de mutaciones en el gen *lcd*, que reducen la actividad enzimática de la proteína.

Debido a que la actividad de la proteína *lcd* es reducida por la fosforilación, también puede ser controlada introduciendo genes *aceK* mutantes que tienen mayor actividad de cinasa o menor actividad de fosfatasa, en comparación con la enzima *AceK* natural.

El aumento de la actividad de la isocitrato liasa puede efectuarse ya sea mediante la atenuación del nivel de genes *iclR* o *fadR*, que codifican para represores de la vía de glioxilato, ya sea mediante la estimulación de la expresión del gen *aceA*, por ejemplo, introduciendo promotores artificiales que conducen la expresión del gen, o introduciendo mutaciones en el gen *AceA* que incrementan la actividad de la proteína codificada.

Una forma de realización de la invención proporciona un mejor rendimiento de la producción de glicolato, mediante el incremento de la disponibilidad de NADPH para la glioxilato reductasa dependiente de NADPH. Esta modificación de las características del microorganismo puede obtenerse a través de la atenuación de por lo menos uno de los genes seleccionados de entre los siguientes: *pgi*, que codifica la glucosa-6-fosfato isomerasa; *udhA*, que codifica la transhidrogenasa soluble; y *edd*, que codifica la actividad de 6-fosfogluconato deshidratasa. Con tales modificaciones genéticas, todo el glucosa-6-fosfato tendrá que entrar en glicólisis a través de la vía de pentosa fosfato, y se producirán 2 NADPH por glucosa-6-fosfato metabolizado.

En otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para la producción de ácido glicólico por fermentación, a partir de un organismo recombinado, que comprende: (a) el contacto del organismo recombinado de la presente invención, con por lo menos una fuente de carbono seleccionada de entre el grupo que consiste en glucosa, sacarosa, monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, almidón o sus derivados, glicerol y sustratos de carbono simple, con lo cual se produce ácido glioxílico. Opcionalmente, el procedimiento comprende una etapa de concentración de glicolato en las bacterias o en el medio, y la aislación de ácido glicólico del caldo de fermentación o la biomasa que, en forma opcional, permanece en porciones o en la cantidad total (0-100%) en el producto final. Opcionalmente, el procedimiento comprende una etapa de recuperación del ácido glicólico producido en la etapa (a), a través de una etapa de polimerización hasta por lo menos dímeros de ácido glicólico; y (b) la recuperación de ácido glicólico mediante la despolimerización a partir de dímeros, oligómeros y/o polímeros de ácido glicólico.

Los expertos en la materia podrán definir las condiciones de cultivo para los microorganismos de acuerdo con la invención. En particular, las bacterias son fermentadas a una temperatura entre 20°C y 55°C, preferentemente, entre 25°C y 40°C, y más específicamente, aproximadamente 30°C para *C. glutamicum*, aproximadamente 37°C, para *E. coli*.

La fermentación se lleva a cabo, en general, en fermentadoras con un medio de cultivo inorgánico de composición definida conocida, adaptada para las bacterias utilizadas, que contiene por lo menos una fuente de carbono simple, y si es necesario, un cosustrato necesario para la producción del metabolito.

La invención se refiere además al microorganismo descrito anteriormente. Preferentemente, este microorganismo se selecciona de entre el grupo que consiste en *E. coli*, *C. glutamicum* o *S. cerevisiae*.

Ejemplo 1

Construcción de cepas que no pueden metabolizar glioxilato, excepto para reducirlo a glicolato: MG1655 Δ aceB Δ gcl Δ glcB

Para eliminar el gen *aceB*, se usa la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o kanamicina, y a la vez, se eliminan la mayoría de los genes en cuestión. Para este propósito, se usan los siguientes oligonucleótidos:

DaceBF (SEC ID n°: 1)

ggcaacaacaaccgatgaactggcttcacaagccgatgtagcagcaggagaagcaattctactgccgaagcggtagCATATGAATATCCTCC
TTAG

con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (4213068-4213147) del gen *aceB* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);

- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645);

DaceBR (SEC ID n°: 2)

ggcggtagcctggcagggtcaggaaatcaattaactcatcggaagtggtagctgttccatcaagcgtgcggcatcgtcTGTAGGCTGGAGCTGCTT
CG

con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (4214647-4214569) del gen *aceB* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);

- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos DaceBF y DaceBR se usan para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3. El producto de PCR obtenido entonces se introduce por electroporación en la cepa MG1655 (pKD46), en la cual la enzima recombinasa Red expresada permite la recombinación homóloga. A continuación se

seleccionan los transformantes resistentes a cloranfenicol, y se verifica la inserción del casete de resistencia por medio de un análisis de PCR con los oligonucleótidos aceBF y aceBR, definidos a continuación. La cepa retenida se designa como MG1655 Δ aceB::Cm.

- 5 aceBF (SEC ID nº: 3): cgttaagcgattcagcaccttacc (homólogo a la secuencia de 4212807 a 4212830).
 aceBR (SEC ID nº: 4): ccagtttctgaatagcttcc (homólogo a la secuencia de 4215327 a 4215308).

A continuación, el gen *gcl* es eliminado en la cepa MG1655 Δ aceB::Cm por medio de la transducción. En primer lugar, se construye la cepa MG1655 Δ gcl::Km usando el mismo método que el descrito anteriormente, con los siguientes oligonucleótidos:

DgclF (SEC ID nº: 5)

15 ggcaaaaatgagagccggtgacgcggaatgtatgtgctggagaaagaaggtatcactaccgccttcggtgtccgggagcTGTAGGCTGGAGCTG
 CTTCG

con

- 20 - una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (533142-533224) de la región del gen *gcl* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
 - una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645);

25 DgipR (SEC ID nº: 6)

 gcggttacgtttaacggtagcggatccatccagcgtaaaccggtccggtggtggtttatattcacaccaacccCATATGAATATCCTCCTTA
 G

30 con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (535720-535640) de la región del gen *gcl* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
 - una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos DgclF y DgipR se usan para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto de PCR obtenido entonces se introduce por electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). A continuación se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y se verifica la inserción del casete de resistencia por medio de un análisis de PCR, con los oligonucleótidos gclF y gipR definidos a continuación. La cepa retenida se designa como MG1655 Δ gcl::Km.

- 45 gclF (SEC ID nº: 7): ggatagcccaccttgctgaagg (homólogo a la secuencia de 532795 a 532817);
 gipR (SEC ID nº: 8): cgcttagttcaatcggggaaatgg (homólogo a la secuencia de 536114 a 536090).

Para transferir la eliminación Δ gcl::Km, se usa el método de transducción de fago P1. El protocolo por seguir se implementa en dos etapas, con la preparación del lisado de fagos de la cepa MG1655 Δ gcl::Km, y a continuación, la transducción en la cepa MG1655 Δ aceB::Cm. La construcción de la cepa se describe anteriormente.

50 Preparación de lisado de fagos P1:

- Inoculación con 100 μ l de un cultivo de toda la noche de la cepa MG1655 Δ gcl::Km de 10 ml de LB + Km, 50 μ g/ml, + glucosa, 0,2%, + CaCl₂, 5 mM.
 - Incubación durante 30 min a 37°C con agitación.
 - Adición de 100 μ l de lisado de fagos P1 preparado en la cepa MG1655 (aproximadamente 1,10⁹ fagos/ml).
 - Agitación a 37°C durante 3 horas hasta el lisado de todas las células.

ES 2 691 206 T3

- Adición de 200 µl de cloroformo y torbellino.
- Centrifugación durante 10 min a 4500 g para eliminar los restos celulares.
- 5 - Transferencia de sobrenadante a un tubo estéril, y adición de 200 µl de cloroformo.
- Almacenamiento del lisado a 4°C.

Transducción

- 10 - Centrifugación durante 10 min a 1500 g de 5 ml de un cultivo de toda la noche de la cepa MG1655 $\Delta aceB::Cm$ en medio LB.
- Suspensión de la miniesfera celular en 2,5 ml de $MgSO_4$, 10 mM; $CaCl_2$, 5 mM.
- 15 - Tubos de control: 100 µl de células;
100 µl de fagos P1 de la cepa MG1655 $\Delta gcl::Km$.
- 20 - Tubo de ensayo: 100 µl de células + 100 µl de fagos P1 de la cepa MG1655 $\Delta gcl::Km$.
- Incubación durante 30 min a 30°C sin agitación.
- Adición de 100 µl de citrato de sodio, 1 M, en cada tubo, y torbellino.
- 25 - Adición de 1 ml de LB.
- Incubación durante 1 hora a 37°C con agitación.
- 30 - Esparcimiento sobre discos LB + Km, 50 µg/ml, tras el centrifugado de los tubos durante 3 min a 7000 rpm
- Incubación a 37°C durante la noche.

Verificación de la cepa.

35 A continuación, se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y se verifica la eliminación del gen $\Delta gcl::Km$ por medio de un análisis de PCR, con los oligonucleótidos *gclF* y *gipR* descritos anteriormente. La cepa retenida se designa como MG1655 $\Delta aceB::Cm \Delta gcl::Km$.

40 A continuación pueden eliminarse los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol. El plásmido pCP20, que porta FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol, se introduce entonces en los sitios de recombinación, mediante electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, se verifica la pérdida de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol por medio de un análisis de PCR, con los mismos oligonucleótidos que los utilizados anteriormente (*aceBF/aceBR* y *gclF/gipR*). La cepa retenida se designa como MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl$.

45 A continuación, se elimina el gen *glcB* en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl$, mediante la transducción. En primer lugar, se construye la cepa MG1655 $\Delta glcB::Km$ usando el mismo método que el descrito anteriormente, con los siguientes oligonucleótidos:

50 DglcBR (SEC ID n°: 9)

cccagagccgtttacgcattgacgccaatTTTaaacgTTTTgtgatgaagaagTTTaccgggaacagggctggacgcCATATGAATATCCTCCTTA
G

55 con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (3121805-3121727) de la región del gen *glcB* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
- 60 - una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del gen de resistencia a kanamicina (secuencia de

referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645);

DgIcBF (SEC ID n°: 10)

5 cgcgtaaaccgagcggtgtaataacggttcggtatagccggttgctgttcacgccgaggaagattaaatcgctggcTGTAGGCTGGAGCTGCTT
CG

con

- 10 - una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (3119667-3119745) de la región del gen *gIcB*
(secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia
de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645).

15 Los oligonucleótidos DgIcBF y DgIcBR se usan para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del
plásmido pKD4. El producto de PCR obtenido entonces se introduce por electroporación en la cepa MG1655
(pKD46). A continuación se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y se verifica la inserción del
casete de resistencia por medio de un análisis de PCR, con los oligonucleótidos gIcBF y gIcBR definidos a
20 continuación. La cepa retenida se designa como MG1655 Δ *gIcB*::Km.

gIcBR (SEC ID n°: 11): gccagcaaatggcgagtgc (homólogo a la secuencia de 3122225 a 3122207).

gIcBF (SEC ID n°: 12): cgcagatcgttaagatgctc (homólogo a la secuencia de 3119475 a 3119497).

25 Para transferir la eliminación Δ *gIcB*::Km, se usa el método de transducción de fagos P1. Se utiliza la preparación del
lisado de fagos de la cepa MG1655 Δ *gIcB*::Km para la transducción en la cepa MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl*.

A continuación, se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y se verifica la eliminación del gen
 Δ *gIcB*::Km por medio de un análisis de PCR con los oligonucleótidos definidos anteriormente, gIcBF y gIcBR. La cepa
30 retenida se designa como MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl* Δ *gIcB*::Km.

A continuación puede eliminarse el casete de resistencia a kanamicina. El plásmido pCP20, que porta FLP
recombinasa que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a kanamicina, se introduce entonces en los sitios
de recombinación mediante la electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, se verifica la pérdida del
casete de resistencia a kanamicina por medio de un análisis de PCR con los mismos oligonucleótidos utilizados
35 anteriormente (gIcBF y gIcBR). La cepa retenida se designa como MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl* Δ *gIcB*.

Ejemplo 2

40 Construcción de cepas con mayor nivel de glioxilato reductasa dependiente de NADPH: MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl* Δ *gIcB*
(pME101-ycdW)

Para reforzar el nivel de glioxilato reductasa dependiente de NADPH, el gen *ycdW* se expresa desde el plásmido
pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990, *NAR* 18, 15 p. 4631) usando el promotor *P_{trc}*. Para la expresión desde un vector
de bajo número de copias, se construye el plásmido pME101, de la siguiente manera. El plásmido pCL1920 se
45 amplifica por PCR, usando los oligonucleótidos PME101F y PME101R y el fragmento *Bst*Z171-Xmnl del vector
PTRC99A que aloja el gen *lacI*, y se inserta el promotor *P_{trc}* en el vector amplificado.

PME101F (SEC ID n°: 13): Ccgacagtaagacgggtaagcctg

50 PME101R (SEC ID n°: 14): Agcttagtaaagccctcgctag

El gen *ycdW* se amplifica por PCR a partir de ADN genómico, usando los siguientes oligonucleótidos:

55 *Bsp*HI *ycdW* (SEC ID n°: 15): agctagctctcatgagaaataaattcgcaacgcgttttcggg

*Sma*I *ycdW* (SEC ID n°: 16): gcatgcatcccggtctctcctgtattcaattcccgcc

El fragmento de PCR se digiere con *Bsp*HI y *Sma*I, y se clona en el vector pME101 cortado por las enzimas de
restricción *Nco*I y *Sma*I, para lograr el plásmido pME101-ycdW.

60 El plásmido pME101-ycdW a continuación se introduce en la cepa MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl* Δ *gIcB*.

Ejemplo 3

Construcción de cepas con menor consumo de glicolato: MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcDEFGB \Delta aldA$ (pME101-ycdW)

5 Se eliminan los genes *glcDEFGB* en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl$, por medio de la transducción.

En primer lugar, se construye la cepa MG1655 $\Delta glcDEFGB::Km$ usando el mismo método que el descrito anteriormente, con los siguientes oligonucleótidos:

10 DglcDR (SEC ID n°: 17)

cgctcttgatggcgctttaccgatgacccgacatcggtactgatggcactgctgagcatgctcctggactgagatccCATATGAATATCCTCCT
TAG

15 con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (3126016-3125934) del gen *glcD* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);

20 - una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645);

DglcBF (SEC ID n°: 18)

25 cgcgtaaaccgaggcgtgtaataacggttcggtatagccggttgctgttcacgccgaggaagattaatcgctggcTGTAGGCTGGAGCTGCTT
CG

con

30 - una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (3119667-3119745) de la región del gen *glcB* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);

- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia de cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645).

35 Se usan los oligonucleótidos DglcDR y DglcBF para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto de PCR obtenido a continuación se introduce por medio de la electroporación en la cepa MG1655 (pKD46), en la cual la enzima recombinasa Red expresada permite la recombinación homóloga. A continuación, se seleccionan los transformantes resistentes a cloranfenicol, y se verifica la inserción del casete de resistencia por medio de un análisis de PCR, con los oligonucleótidos *glcDR* y *glcBF* definidos a continuación. La cepa retenida se designa como MG1655 $\Delta glcDEFGB::Km$.

glcDR (SEC ID n°: 19): ccaagacaagggtcacagagc (homólogo a la secuencia de 3126183 a 3126164).

glcBF (SEC ID n°: 20): cgcagagtatcgtaagatgtcc (homólogo a la secuencia de 3119475 a 3119497).

45 Para transferir la eliminación $\Delta glcDEFGB::Km$, se usa el método de transducción de fagos P1. Se utiliza la preparación del lisado de fagos de la cepa MG1655 $\Delta glcDEFGB::Km$, para la transducción en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl$.

50 A continuación, se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y se verifica la eliminación del gen $\Delta glcDEFGB::Km$ por medio de un análisis de PCR con los oligonucleótidos previamente definidos, *glcBF* y *glcDR*. La cepa retenida se designa como MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcDEFGB::Km$.

55 A continuación, se elimina el gen *aldA* en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcDEFGB::Km$, por medio de la transducción. En primer lugar, se construye la cepa MG1655 $aldA::Cm$ usando el mismo método que el descrito anteriormente, con los siguientes oligonucleótidos:

AldA D r (SEC ID n°: 21)

60 ttaagactgtaaataaaccacctgggtctgcagatattcatgcaagccatgtttaccatctgctgcccgaataaccggatttCATATGAATATCCTCCTTA
G

con

- 5
- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (1487615 a 1487695) del gen *aldA* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
 - una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645);

10 AldA D f (SEC ID nº: 22)

atgctgaccgttcaacatcctatgtatatacgatggacagttgttacctggcgtggagacgcattgattgatgtgtaGTGTAGGCTGGAGCTGCTT
CG

15 con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (1486256 a 1486336) del gen *aldA* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645).

25 Los oligonucleótidos aldAF y aldAR se usan para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3. El producto de PCR obtenido a continuación se introduce mediante la electroporación en la cepa MG1655 (pKD46), en la cual la enzima recombinasa Red expresada permite la recombinación homóloga. Entonces se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y se verifica la inserción del casete de resistencia por medio de un análisis de PCR con los oligonucleótidos YdcFCf y gapCCR definidos a continuación. La cepa retenida se designa como MG1655 Δ aldA::Cm.

- 30 YdcFCf (SEC ID nº: 23): tgcagcggcgcacgatggcgcagttccg (homóloga a la secuencia de 1485722 a 1485752).
gapCCR (SEC ID nº: 24): cactgatgacgacattcatgcctatactggc (homóloga a la secuencia de 1488195 a 1488225).

35 Para transferir la eliminación Δ aldA::Cm, se usa el método de transducción de fagos P1. Se utiliza la preparación del lisado de fagos de la cepa MG1655 Δ aldA::Cm para la transducción en la cepa MG1655 Δ aceB Δ gcl Δ gclDEFGB::Km.

40 A continuación, se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y se verifica la eliminación del gen Δ aldA::Cm por medio de un análisis de PCR con los oligonucleótidos definidos anteriormente, YdcFCf y gapCCR. La cepa retenida se designa como MG1655 Δ aceB Δ gcl Δ gclDEFGB::Km Δ aldA::Cm.

45 A continuación pueden eliminarse los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol. Se introduce entonces el plásmido pCP20, que porta FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol, en los sitios de recombinación, mediante la electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, se verifica la pérdida de los casetes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol por medio de un análisis de PCR, con los mismos oligonucleótidos que los utilizados anteriormente (gclBF/gclDR y YdcFCf/gapCCR). La cepa retenida se designa como MG1655 Δ aceB Δ gcl Δ gclDEFGB Δ aldA. A continuación, se introduce el plásmido pME101-ycdW en la cepa MG1655 Δ aceB Δ gcl Δ gclDEFGB Δ aldA.

50 **Ejemplo 4**

Construcción de cepas con mayor flujo en la vía de glioxilato: MG1655 Δ aceB Δ gcl Δ gclDEFGB Δ aldA Δ icIR (pME101-ycdW)

55 Se introduce la eliminación de gen *icIR* en la cepa MG1655 Δ aceB Δ gcl Δ gclDEFGB Δ aldA, usando la misma estrategia que la descrita anteriormente, con los siguientes oligonucleótidos:

DicIF (SEC ID nº: 25)

60 CgcaccattcccgcgaaacgcggcagaaaacccgctgcccaccgcaccagcgactggacaggttcagtcttaacgcgTGTAGGCTGGAGCT
GCTTCG

con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (4221202-4221120) del gen *icR* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645);

DicIR (SEC ID n°: 26)

gcgcattccaccgtacgccagcgtcacttccttcgccgcttaatcaccatcgcgcaaaactcggtcacgcggtcatcggCATATGAATATCCTCCTTA
G

con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (4220386-4220465) del gen *icR* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos DicIF y DicIR se usan para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto de PCR obtenido entonces se introduce por electroporación en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta gclDEFGB \Delta aldA$ (pKD46). A continuación se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y se verifica la inserción del casete de resistencia por medio de un análisis de PCR, con los oligonucleótidos icIF e icIR definidos a continuación. La cepa retenida se designa como MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta gclDEFGB \Delta aldA \Delta icR::Km$.

icIF (SEC ID n°: 27): cctttgaggtcgcacgtgccagtcggc (homólogo a la secuencia de 4221558 a 4221533).

icIR (SEC ID n°: 28): gcttttaataagagcgctgccagctccttgcc (homólogo a la secuencia de 4219917 a 4219949).

A continuación, puede eliminarse el casete de resistencia a kanamicina. El plásmido pCP20, que porta FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a kanamicina, entonces se introduce en los sitios de recombinación mediante la electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, se verifica la pérdida del casete de resistencia a kanamicina por medio de un análisis de PCR, con los mismos oligonucleótidos que los utilizados anteriormente (icIF e icIR). La cepa retenida se designa como MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta gclDEFGB \Delta aldA \Delta icR$. A continuación se introduce el plásmido pME101-ycdW en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta gclDEFGB \Delta aldA \Delta icR$.

Ejemplo 5

Construcción de cepas con mayor disponibilidad de NADPH: MG1655 $\Delta ACEB \Delta GCL \Delta icLR \Delta gclDEFGB \Delta ALDA \Delta EDD-EDA$ (PME101-YCDW)

Se eliminan los genes *edd-eda* en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta gclB \Delta gclDEF \Delta aldA \Delta icR$, por medio de la transducción.

En primer lugar, se construye la cepa MG1655 $\Delta edd-eda::Cm$ usando el mismo método que el descrito anteriormente, con los siguientes oligonucleótidos:

DeddF (SEC ID n°: 29)

CgcgcgagactcgctctgcttatctcgcccggatagaacaagcgaactcgcaccgttcacgttcgcagttggcatcggTG TAGGCTGGAGCTG
CTTCG

con:

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (1932582-1932500) de la región de los genes *edd-eda* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645);

DedaR (SEC ID nº: 30)

gcttagcgcttctacagcttcacgcccagcttagtaatgcggtcgtaatgcccccttcagcgcatctgccggaaccCATATGAATATCCTCCTTA
G

con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (1930144-1930223) de la región de los genes *edd-eda* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos DeddF y DedaR se usan para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3. El producto de PCR obtenido entonces se introduce, mediante electroporación, en la cepa MG1655 (pKD46). A continuación, se seleccionan los transformantes resistentes a cloranfenicol, y se verifica la inserción del casete de resistencia por medio de un análisis de PCR, con los oligonucleótidos *eddF* y *edaR* definidos a continuación. La cepa retenida se designa como MG1655 Δ *edd-eda*::Cm.

eddF (SEC ID nº: 31): Gggtagactccattactgaggcgtggcg (homólogo a la secuencia de 1932996 a 1932968).

edaR (SEC ID nº: 32): ccacatgataccggatggtgacg (homólogo a la secuencia de 1929754 a 1929777).

Para transferir la eliminación Δ *edd-eda*::Cm, se usa el método de transducción de fagos P1 descrito anteriormente. Se utiliza la preparación del lisado de fagos de la cepa MG1655 Δ *edd-eda*::Cm para la transducción en la cepa MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl* Δ *glcDEFGB* Δ *aldA* Δ *icR*.

A continuación se seleccionan los transformantes resistentes a cloranfenicol, y se verifica la eliminación del gen Δ *edd-eda*::Cm por medio de un análisis de PCR con los oligonucleótidos *eddF* y *edaR*. La cepa retenida se designa como MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl* Δ *glcB* Δ *glcDEF* Δ *aldA* Δ *icR* Δ *edd-eda*::Cm.

A continuación, puede eliminarse el casete de resistencia a cloranfenicol. El plásmido pCP20, que porta FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a cloranfenicol, se introduce entonces en los sitios de recombinación mediante la electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, se verifica la pérdida del casete de resistencia a cloranfenicol, por medio de un análisis de PCR usando los mismos oligonucleótidos que los descritos anteriormente (*eddF* y *edaR*). La cepa retenida se designa como MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl* Δ *glcDEFGB* Δ *aldA* Δ *icR* Δ *edd-eda*.

Se introduce entonces el plásmido pME101-ycdW en la cepa MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl* Δ *glcDEFGB* Δ *aldA* Δ *icR* Δ *edd-eda*.

Ejemplo 6

Construcción de cepas con mayor disponibilidad de NADPH: MG1655 Δ *ACEB* Δ *GCL* Δ *ICLR* Δ *GLCDEFGB* Δ *ALDA* Δ *PGI*::CM Δ *EDD-EDA* (PME101-YCDW)

Se introduce la eliminación de gen *pgi* en la cepa MG1655 Δ *aceB* Δ *gcl* Δ *glcB* Δ *glcDEF* Δ *aldA* Δ *icR* Δ *edd-eda*, utilizando la misma estrategia que la descrita anteriormente, con los siguientes oligonucleótidos:

DpgiF (SEC ID nº: 33)

ccaacgcagaccgctgctggcaggcactacagaacacttcgatgaaatgaaagacgttacgatcgccgatcttttgcTGTAGGCTGGAGCTGC
TTCG

con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (4231352-4231432) del gen *pgi* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);
- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645);

DpgiR (SEC ID nº: 34)

gcccacgctttatagcggtaaatcagaccattggtcgagctatcggtgctgatttctttatcatctttcagctctgCATATGAATATCCTCCTTAG

con

- una región (caracteres en minúscula) homóloga a la secuencia (4232980-4232901) del gen *pgi* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);

- una región (caracteres en mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos DpgiF y DpgiR se usan para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3. El producto de PCR obtenido a continuación se introduce por medio de la electroporación, en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcB \Delta glcDEF \Delta aldA \Delta iclR \Delta edd-eda$ (pKD46). A continuación, se seleccionan los transformantes resistentes a cloranfenicol, y se verifica la inserción del casete de resistencia mediante un análisis de PCR, con los oligonucleótidos pgiF y pgiR definidos a continuación. La cepa retenida se designa como MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcB \Delta glcDEF \Delta aldA \Delta iclR \Delta edd-eda \Delta pgi::Cm$.

pgiF (SEC ID nº: 35): gcgggcggtgtcaacgatggggtcatgc (homólogo a la secuencia de 4231138 a 4231167).

pgiR (SEC ID nº: 36): cggtatgatttcgtaaattacagacaag (homólogo a la secuencia de 4233220 a 4233191).

A continuación se introduce el plásmido pME101-ycdW en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcDEFGB \Delta aldA \Delta iclR \Delta edd-eda \Delta pgi::Cm$.

Ejemplo 7

Construcción de cepas con mayor disponibilidad de NADPH: MG1655 $\Delta ACEB \Delta GCL \Delta ICLR \Delta GLCDEFGB \Delta ALDA \Delta PGI \Delta EDD-EDA::CM \Delta UDHA::KM$ (PME101-YCDW)

Se introduce la eliminación de gen *udhA* en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcDEFGB \Delta aldA \Delta iclR \Delta pgi::Cm \Delta edd-eda$, usando la misma estrategia que la descrita anteriormente, con los siguientes oligonucleótidos:

DudhAF (SEC ID nº: 37)

CCCAGAATCTCTTTTGTTCCTCCGATGGAACAAAATTTTCAGCGTGCCACGTTTCATGCCGACGATTTGTGCGC
GTGCCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

con

- una región (caracteres en negrita) homóloga a la secuencia (4157588-4157667) del gen *udhA* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);

- una región (caracteres subrayados) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645);

DudhAR (SEC ID nº: 38)

GGTGCGCGCTCGCAGTTATCGAGCGTTATCAAAATGTTGGCGCGGTTGCACCCACTGGGGCACCATCCC
GTCGAAAGCCATATGAATATCCTCCTTAG

con

- una región (caracteres en negrita) homóloga a la secuencia (4158729-4158650) del gen *udhA* (secuencia de referencia en el sitio de Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>);

- una región (caracteres subrayados) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., 2000, *PNAS*, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos DudhAF y DudhAR se usan para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del

plásmido pKD4. El producto de PCR obtenido a continuación se introduce mediante electroporación en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcDEFGB \Delta aldA \Delta icR \Delta pgi::Cm \Delta edd-eda$ (pKD46). A continuación, se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y se verifica la inserción del casete de resistencia por medio de un análisis de PCR con los oligonucleótidos udhAF y udhAR definidos a continuación. La cepa retenida se designa como MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcDEFGB \Delta aldA \Delta icR \Delta pgi::Cm \Delta edd-eda \Delta udhA::Km$.

udhAF (SEC ID n°: 39): (homólogo a la secuencia de 4157088 a 4157108).

GATGCTGGAAGATGGTCACT

udhAR (SEC ID n°: 40): (homólogo a la secuencia de 4159070 a 4159052).

gtgaatgaacggaacgc

Se introduce entonces el plásmido pME101-ycdW en la cepa MG1655 $\Delta aceB \Delta gcl \Delta glcDEFGB \Delta aldA \Delta icR \Delta pgi::Cm \Delta edd-eda \Delta udhA::Km$.

15 Ejemplo 8

Fermentación de cepas productoras de ácido glicólico en matraces de Erlenmeyer

Se evaluaron inicialmente los comportamientos de las cepas en 250 ml de cultivos de matraces de Erlenmeyer con tabique, usando medio M9 modificado (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 32: 120-128), suplementado con 40 g/l de MOPS y 10 g/l de glucosa, y ajustado a pH 6,8. Si fue necesario, se agregó espectinomicina en una concentración de 50 mg/l, y se agregaron también 100 μ m de IPTG para la inducción del vector de expresión, si estaba presente. Se usó un precultivo de toda la noche para inocular un cultivo de 50 ml hasta una $OD_{600 \text{ nm}}$ de aproximadamente 0,3. Los cultivos se mantuvieron en una agitadora a 30°C y 400 rpm, hasta que se agotó la glucosa en el medio de cultivo. Al final del cultivo, se analizaron la glucosa y el ácido glicólico por medio de la HPLC, usando una columna Biorad HPX 97H para la separación, y un refractómetro, para la detección.

La comparación de los comportamientos de las diferentes cepas se proporciona en la tabla siguiente (en la que cada valor es la media de n repeticiones). La cepa que se describe en el ejemplo 1 no mostró ninguna producción de ácido glicólico.

Cepa de ejemplo n°	2	3	4	5	6	7
Genotipo (<i>E. coli</i> MG1655)	$\Delta aceB \Delta gcl \Delta g/cB$ (pME101-ycdW)	$\Delta aceB \Delta gcl \Delta g/cDEFGB \Delta aldA$ (pME101-ycdW)	$\Delta aceB \Delta gcl \Delta g/cDEFGB \Delta aldA \Delta iclR$ (pME101-ycdW)	$\Delta aceB \Delta gcl \Delta g/cDEFGB \Delta aldA \Delta iclR \Delta edd-eda$ (pME101-ycdW)	$\Delta aceB \Delta gcl \Delta g/cDEFGB \Delta aldA \Delta iclR \Delta edd-eda \Delta pgi$ (pME101-ycdW)	$\Delta aceB \Delta gcl \Delta g/cDEFGB \Delta aldA \Delta iclR \Delta edd-eda \Delta pgi \Delta urdHA$ (pME101-ycdW)
Producción de ácido glicólico (g/l)	0,28 (n = 3)	0,28 (n = 8)	0,65 n = 8)	1,73 (n = 8)	2,75 (n = 6)	2,33 (n = 4)
Rendimiento (g ácido glicólico/g glucosa)	0,03 (n = 3)	0,03 (n = 8)	0,07 (n = 8)	0,17 (n = 8)	0,29 (n = 6)	0,25 (n = 4)

Las cepas que se describen en el ejemplo 6 y en el ejemplo 7 son las mejores productoras de ácido glicólico, con valoraciones superiores a 2 g/l, y rendimientos superiores a 0,2 g/g.

Ejemplo 9

5

Fermentación de cepas productoras de ácido glicólico en fermentadora de alimentación en lotes

Se evaluaron las cepas descritas en el ejemplo 6 y en el ejemplo 7 en condiciones de producción, en una fermentadora de 600 ml usando un protocolo de alimentación en lotes.

10

Se llevó a cabo un primer precultivo en medio LB suplementado con 2,5 g/l de glucosa, a 30°C, seguido de un segundo precultivo en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml, que contenía 50 ml de medio sintético suplementado con 40 g/l de MOPS y 10 g/l de glucosa (el mismo medio utilizado para cultivos en matraz), a 30°C. Este segundo precultivo se usó para inoculación de la fermentadora.

15

La fermentadora, que contenía 200 ml de medio sintético suplementado con 40 g/l de glucosa, 50 mg/l de espectinomicina, e IPTG, 100 µM, se inoculó a una densidad óptica inicial de aproximadamente 2. El cultivo se llevó a cabo a 30°C con agitación y aireación ajustada para mantener el oxígeno disuelto superior al 30% de saturación. Se ajustó el pH a 6,8 mediante la adición de base. El cultivo se llevó a cabo en un modo de lotes hasta el agotamiento de la glucosa. En dicho momento, se agregó una solución de 500 g/l de glucosa suplementada con sulfato de magnesio, oligoelementos, espectinomicina e IPTG, para restaurar una concentración de 40 g/l de glucosa en el medio. Se realizaron otras adiciones cada vez que se consumía la glucosa.

20

En la rutina, la cepa descrita en el ejemplo 7 proporcionó un mejor rendimiento de producción que la cepa descrita en el ejemplo 6, en fermentadoras (rendimiento a partir de glucosa: 0,22 g/g, en comparación con 015 g/g).

25

A continuación se proporciona una representación del curso de tiempo de fermentación para la producción de ácido glicólico, usando la cepa del ejemplo 7.

30

Tiempo (h)	OD _{600 nm} (AU)	Glucosa (g/l)	Ácido glicólico (g/l)
0	2,0	35,45	0,11
16	3,7	34,70	0,57
20	5,1	33,25	1,14
25	6,7	31,24	1,81
39	14,8	20,55	4,75
44	20,3	12,24	7,02
49	27,9	2,48	9,44
64	53,9	7,94	18,80
70	62,8	33,97	21,76
73	67,8	24,54	23,54
87	84,0	36,60	28,70
93	89,6	25,61	31,33

La valoración final obtenida fue de 31 g/l de ácido glicólico, con un rendimiento a partir de glucosa de 0,22 g/g.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción fermentativa de ácido glicólico mediante el cultivo de un microorganismo recombinante modificado para convertir una fuente de carbono en ácido glicólico, en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente fermentable de carbono apta para ser metabolizada por el microorganismo, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 a) fermentar el microorganismo para producir ácido glicólico convirtiendo la fuente de carbono en ácido glicólico,
- b) concentrar el ácido glicólico en el microorganismo o en el medio y
- 15 c) recuperar el ácido glicólico del caldo de fermentación y/o la biomasa que permanece opcionalmente en partes o en la cantidad total (0 - 100%) en el producto final, en el que la fuente fermentable de carbono es un azúcar seleccionado de entre monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos,
- y en el que se modifica el microorganismo para atenuar la conversión de glioxilato en productos diferentes del glicolato, con la atenuación de la expresión de por lo menos un gen, seleccionado de entre los genes siguientes implicados en el metabolismo del glioxilato:
- 20
- *aceB* que codifica la malato sintasa
 - *gicB* que codifica la segunda malato sintasa
 - *gcl* que codifica la glioxilato carboligasa
 - *eda* que codifica 2-ceto-3-desoxiguconato 6-fosfato aldolasa.
- 25 2. Método según la reivindicación 1, en el que el glicolato es aislado a través de una etapa de polimerización a por lo menos dímeros de glicolato.
- 30 3. Método según la reivindicación 2, en el que el glicolato es recuperado mediante la despolimerización a partir de dímeros, oligómeros y/o polímeros de glicolato.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el microorganismo contiene por lo menos un gen que codifica un polipéptido que cataliza la conversión de glioxilato en glicolato.
- 35 5. Método según la reivindicación 4, en el que el gen codifica una glioxilato reductasa dependiente de NADPH.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el gen que codifica un polipéptido con actividad de glioxilato reductasa dependiente de NADPH es endógeno.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la expresión de dicho gen es aumentada.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el gen que codifica un polipéptido con actividad de glioxilato reductasa dependiente de NADPH se selecciona de entre *ycdW* e *yiaE*.
- 45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el microorganismo es modificado de manera que no resulta apto para metabolizar sustancialmente el glicolato, atenuándose la expresión de por lo menos un gen, seleccionado de entre los genes siguientes implicados en el metabolismo de glicolato:
- 50
- *gicDEF* que codifica la glicolato oxidasa
 - *aldA* que codifica la glicolaldehído deshidrogenasa.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se transforma el microorganismo para aumentar el flujo de la vía de glioxilato:
- 55
- atenuando la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa, o
 - atenuando la expresión de por lo menos uno de los genes siguientes:
- 60
- *pta* que codifica la fosfo-transacetilasa
 - *ack* que codifica la acetato cinasa
 - *poxB* que codifica la piruvato oxidasa, o
- aumentando la actividad de *aceA*.
- 65 11. Método según la reivindicación 10, en el que se aumenta la expresión de *aceA* mediante la atenuación de la expresión de los genes *icrR* o *fadR*.

12. Método según la reivindicación 10, en el que se aumenta la expresión de *aceA* introduciendo un promotor artificial aguas arriba del gen *aceA*.

5 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que se aumenta la disponibilidad de NADPH atenuando la expresión de por lo menos un gen, seleccionado de entre los siguientes:

- *pgi* que codifica la glucosa-6-fosfato isomerasa
- *udhA* que codifica la transhidrogenasa soluble
- *edd* que codifica la fosfogluconato deshidratasa.

10

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la fuente de carbono es por lo menos una de las siguientes: glucosa, sacarosa, mono- u oligosacáridos, o almidón.

15

15. Microorganismo recombinante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

16. Microorganismo según la reivindicación 15, que se selecciona de entre el grupo que consiste en *E. coli*, *C. glutamicum* o *S. cerevisiae*.

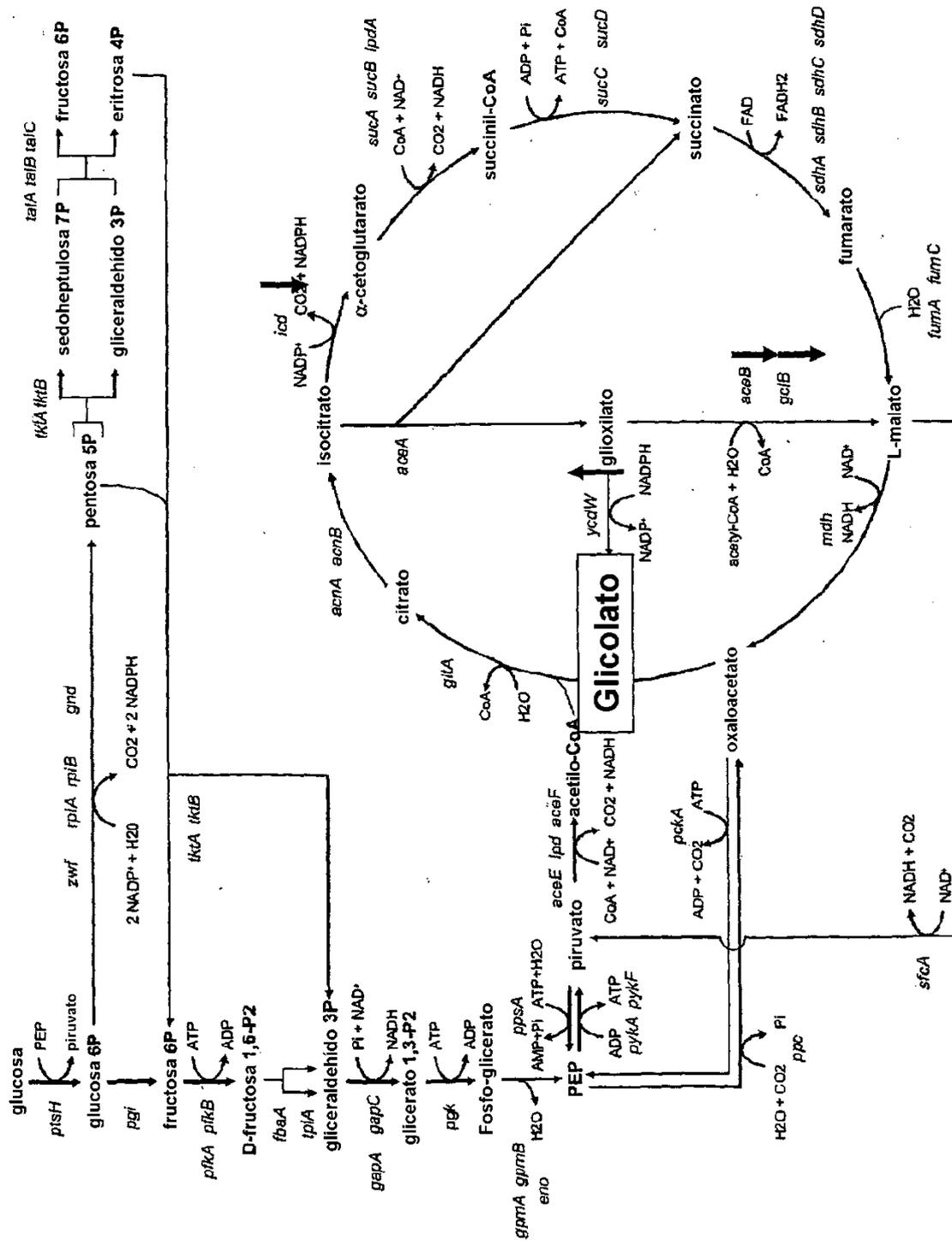


FIG. 1

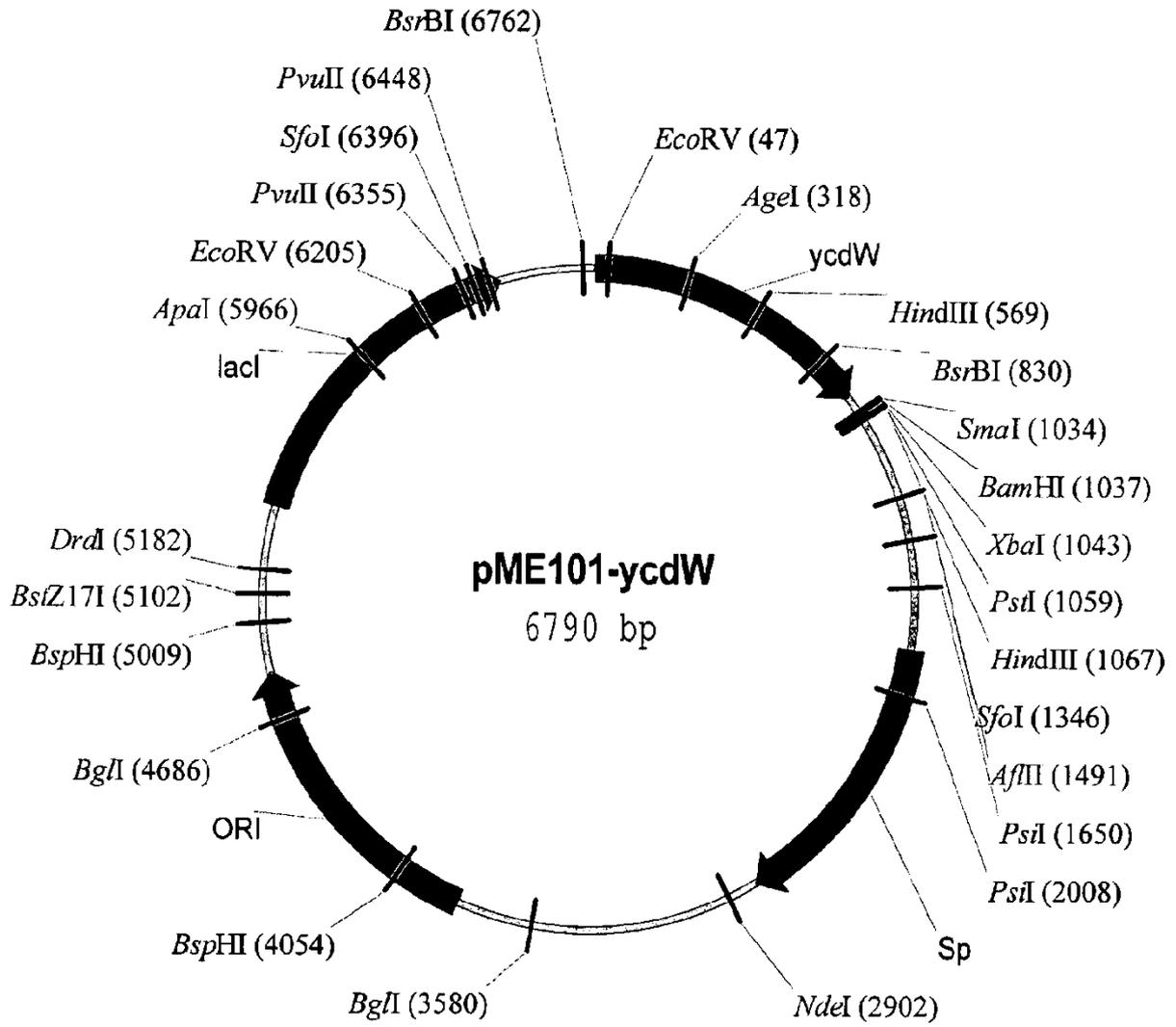


FIG. 2