

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 500**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/19** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 9/16** (2006.01)  
**C12P 7/46** (2006.01)  
**C07C 51/38** (2006.01)  
**C07C 67/08** (2006.01)  
**C07C 67/31** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2013 PCT/US2013/029441**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13134424**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2013 E 13758501 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2823032**

54 Título: **Células huésped recombinantes para la producción de malonato**

30 Prioridad:

**06.03.2012 US 201261607479 P**  
**02.04.2012 US 201261619112 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.02.2019**

73 Titular/es:

**LYGOS, INC. (100.0%)**  
**77 Van Ness Avenue, Suite 101 Mail Stop N° 1953**  
**San Francisco, CA 94102-6042, US**

72 Inventor/es:

**DIETRICH, JEFFREY, A.;**  
**FORTMAN, JEFFREY, L. y**  
**STEEN, ERIC, J.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 698 500 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

Células huésped recombinantes para la producción de malonato

**Antecedentes de la invención**

5 Los problemas económicos y ambientales a largo plazo asociados con la industria petroquímica han proporcionado el impulso para una mayor investigación, desarrollo y comercialización de procedimientos para la conversión de materias primas de carbono en productos químicos que puedan reemplazar a los derivados de materias primas del petróleo. Uno de los enfoques es el desarrollo de procedimientos de biorrefino para convertir materias primas renovables en productos que puedan reemplazar a los productos químicos derivados del petróleo. Dos objetivos comunes para mejorar un procedimiento de biorrefino incluyen lograr un menor coste de producción y reducir las emisiones de dióxido de carbono.

10 Actualmente se produce ácido propanodioico ("malonato", n.º CAS 141-82-2) a partir de productos a partir de materias primas no renovables del petróleo. La monoesterificación o la diesterificación de uno o ambos restos de ácido carboxílico de malonato con un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol) produce los malonatos de monoalquilo y dialquilo, respectivamente. La 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona ("ácido de Meldrum" N.º CAS 2033-24-1) se produce a partir de malonato usando acetona en anhídrido acético o acetato de isopropenilo en ácido.

15 La síntesis química es actualmente la ruta preferente para la síntesis de compuestos de malonato y derivados de malonato. Por ejemplo, los malonatos de dialquilo se producen a través de un procedimiento de cianuro de hidrógeno o monóxido de carbono. En el procedimiento del cianuro de hidrógeno, el cianuro de sodio reacciona con cloroacetato de sodio a temperaturas elevadas para producir cianoacetato de sodio, que posteriormente se hace reaccionar con una mezcla de alcohol/ácido mineral para producir el malonato de dialquilo. Hildbrand y col., notifican rendimientos del 75-85 % (véase "Malonic acid and Derivatives" en: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, Nueva York (2002)). En el procedimiento de monóxido de carbono, los malonatos de dialquilo (también denominados en el presente documento malonatos de diéster) se producen a través de una alcoxycarbonilación catalizada con cobalto de cloroacetatos con monóxido de carbono en presencia de un alcohol a temperaturas y presiones elevadas.

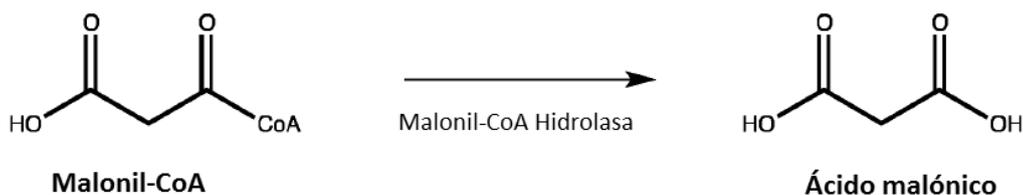
20 Por otro lado, El documento US 2010/0323418 desvela organismos microbianos para la producción de isopropanol, El n-butanol y el isobutanol tienen una enzima de la ruta del isopropanol. Además, S. Lee y col., Biotech and Bioprocess Engineering 16:706-713 (2011) desvelan la mejora de la biosíntesis de ácidos grasos mediante *E. coli* recombinante modificada por ingeniería, S.-H. Lee y col., Appl Microbiol Biotechnol 79: 633-641 (2008) desvelan la biosíntesis de ácido (S)-3-hidroxi-butírico en *E. coli* diseñada por ingeniería metabólica, y C. Oefner y col., Acta Cryst. D62:613-618 (2006) desvelan la proteína transacilasa transportadora malonil-CoA-acil transacilasa (FabD) de *E. coli*, que es una enzima clave en la ruta bacteriana de la biosíntesis de los ácidos grasos.

25 La rutas de producción basadas en productos petroquímicos existentes para el malonato y los compuestos derivados del malonato tienen un rendimiento bajo, producen daños ambientales, dependen de materias primas no renovables y requieren un tratamiento costoso de las aguas residuales y los gases de escape. Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de procedimientos y materiales para la conversión biocatalítica de materias primas renovables en malonato, la purificación del malonato biosintético y la posterior preparación de productos químicos y productos derivados.

**Sumario de la invención**

30 La presente invención proporciona células huésped recombinantes, procedimientos para la producción biológica de malonato y procedimientos para convertir el malonato en otros productos químicos de importancia industrial, en particular acrilatos.

35 En un primer aspecto, la invención proporciona células huésped recombinantes que comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica una acil-CoA hidrolasa que cataliza la conversión de malonil-CoA en ácido malónico, como se ilustra en el presente documento:



Estas células huésped recombinantes producen más malonato que las células homólogas que no comprenden dicha

hidrolasa heteróloga. En varias realizaciones, las células huésped pueden producir al menos 10 g/l de malonato en condiciones de fermentación apropiadas y, en diversas realizaciones, los niveles de producción pueden ser tan altos como de 50 g/l hasta 100 g/l o más. El ácido nucleico heterólogo codifica una célula huésped recombinante que comprende una malonil-CoA hidrolasa heteróloga, en la que dicha malonil-CoA hidrolasa heteróloga se selecciona de: (a) SEQ ID No: 46, 49, 51 y 52, en las que Xaa se selecciona de A, D, R, H, K, S, T, N, Q e Y; (b) SEQ ID No: 45, 48 y 50, en las que Xaa se selecciona de A, D, R, H, K, S, T, N, Q e Y; y (c) SEQ ID No. 47, en la que Xaa es S. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de levadura. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana.

Por lo tanto, en diversas realizaciones, los ácidos nucleicos heterólogos codifican una forma de tipo salvaje o mutada de una acil-CoA hidrolasa. Los ejemplos de acil-CoA hidrolasas codificadas por los ácidos nucleicos adecuados para la hidrólisis de malonil-CoA incluyen enzimas modificadas y de tipo salvaje seleccionadas del grupo que consiste en 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.4), 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.4), acetoacetil-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.11), metilmalonil-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.17), propionil-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.18), succinil-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.3) y malonil-CoA: transacilasas de ACP (EC 2.3.1.39) mutadas como se indica en el presente documento que tienen actividad malonil-CoA hidrolasa.

La malonil-CoA hidrolasa puede ser un mutante de una 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.4). Las 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasas adecuadas pueden obtenerse tanto de eucariotas como de procariotas, incluyendo organismos tanto grampositivos como gramnegativos. En varias realizaciones, la 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa se obtiene de una cepa de levadura, una especie de *Bacillus* y una especie de *Pseudomonas*.

La malonil-CoA hidrolasa puede ser una malonil-CoA: transacilasa ACP (EC 2.3.1.39) mutada como se indica en el presente documento para que tenga actividad malonil-CoA hidrolasa, codificada por un procarionte. En varias realizaciones, el procarionte es una bacteria gramnegativa. En diversas realizaciones de la invención, la bacteria gramnegativa es una *Escherichia*.

En otras realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana. En varias realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana seleccionada del grupo que consiste en *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de *E. coli*.

De manera general, las células huésped recombinantes de la invención se han modificado genéticamente para mejorar el rendimiento de malonato, el título y/o la productividad. En varias realizaciones, las células huésped se han modificado para aumentar la biosíntesis de malonato a través de una o más modificaciones de la célula huésped seleccionadas del grupo que consiste en modificaciones que dan como resultado un aumento de la biosíntesis de acetil-CoA, un aumento de la biosíntesis de malonil-CoA, una disminución de la utilización de malonil-CoA, una disminución del catabolismo de malonato, un aumento de la secreción de malonato en el caldo de fermentación, un aumento de la tolerancia de la célula huésped al malonato en el caldo de fermentación y/o un aumento del catabolismo de la célula huésped de las fuentes de carbono (por ejemplo, acetato, alginato, etanol, ácidos grasos, biomasa lignocelulósica, metanol, azúcares pentosas y gas de síntesis).

En un segundo aspecto, la invención proporciona procedimientos para producir malonato en una célula huésped recombinante que comprende una malonil-CoA hidrolasa heteróloga como se ha definido anteriormente, cuyos procedimientos comprenden cultivar la célula huésped recombinante en caldo de fermentación en condiciones que le permitan producir malonato. La célula huésped ha sido diseñada para expresar más o menos una enzima endógena que da como resultado la producción de más malonato que una célula correspondiente que no ha sido diseñada por ingeniería genética. Por lo tanto, el procedimiento comprende cultivar una célula huésped recombinante que expresa una enzima heteróloga (extraña o no nativa) que da como resultado el aumento de la producción de malonato. La célula huésped usada en el procedimiento comprende uno o más vectores de expresión que comprenden enzimas malonil-CoA hidrolasas heterólogas. En algunas realizaciones de estos procedimientos, el caldo de fermentación se complementa con fuentes de carbono que promueven la producción de malonato y se selecciona del grupo que consiste en celodextrinas, 5 azúcares de carbono, 6 azúcares de carbono, dióxido de carbono, etanol, metanol, glicerol, acetato y/o ácidos grasos.

En un tercer aspecto, la invención proporciona procedimientos para fabricar compuestos de acrilato derivados de malonato; dicho procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende una malonil-CoA hidrolasa heteróloga como se ha definido anteriormente, y hacer reaccionar malonato con paraformaldehído para producir el compuesto de acrilato. En particular, un acrilato se sintetiza a partir de malonato o ácido malónico. En otras realizaciones, el acrilato se sintetiza a partir de monoésteres o diésteres de malonato.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se ilustran en los dibujos adjuntos y se describen con más detalle a continuación.

#### **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra una curva de dosis-respuesta para un biosensor de malonato de *E. coli* MdcY de la invención que utiliza el promotor  $P_{MdcL}$ . El eje X es la concentración de malonato exógeno añadido al caldo de fermentación; el eje Y es la densidad del cultivo celular ( $DO_{600}$ ) después de 12 horas de crecimiento en medio

con 25 µg/ml de tetraciclina. *E. coli* transformada con EL plásmido S14, que comprende un factor de transcripción MdcY y un gen *tetA* bajo el control de un promotor P<sub>MdcL</sub>, produjo la proteína TetA de resistencia a la tetraciclina tras la adición exógena de malonato. El biosensor mostró incrementos dependientes de malonato en la resistencia a la tetraciclina, medidos mediante el aumento de la DO<sub>600</sub> con el aumento DE la concentración de malonato añadido exógenamente como se describe con detalle adicional en el Ejemplo 21.

La figura 2 es un trazado del cromatograma de HPLC que muestra la separación y detección de la producción de ácido acrílico a partir de malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención como se describe en el Ejemplo 28. El eje X muestra la elución del ácido acrílico en aproximadamente 17,5 minutos y el eje Y muestra unidades arbitrarias derivadas de la detección de ácido acrílico a través de un detector de UV que controla a 210 nm. El ácido acrílico producido a partir de malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención (línea discontinua) exhibió el mismo tiempo de retención que un patrón de ácido acrílico auténtico (línea continua).

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona células huésped recombinantes, procedimientos para la producción biológica de malonato y la conversión sintética de malonato en productos químicos de importancia industrial.

Aunque la presente invención se describe en el presente documento con referencia a aspectos y realizaciones específicas de la misma, los expertos en la técnica reconocerán que pueden realizarse diversos cambios y pueden sustituirse equivalentes sin apartarse de la invención. La presente invención no se limita a ácidos nucleicos particulares, vectores de expresión, enzimas, microorganismos huésped o procedimientos, ya que pueden variar. La terminología utilizada en el presente documento tiene la finalidad de describir solo aspectos y realizaciones particulares, y no debe interpretarse como limitante. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación particular, material, composición de la materia, procedimiento, etapa o etapas del procedimiento, de acuerdo con la invención. Todas estas modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

### **Sección 1: Definiciones**

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que se definirán para que tengan los siguientes significados.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una/uno", y "el" o "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un "vector de expresión" incluye un solo vector de expresión, así como una pluralidad de vectores de expresión, ya sea el mismo (por ejemplo, el mismo operón) o diferente; la referencia a "célula" incluye una sola célula así como una pluralidad de células; y similares.

Los aminoácidos en una secuencia codificante de proteínas se identifican en el presente documento mediante las siguientes abreviaturas y símbolos. Los aminoácidos específicos se identifican con una abreviatura de una sola letra, del modo siguiente: A es alanina, R es arginina, N es asparagina, D es ácido aspártico, C es cisteína, Q es glutamina, E es ácido glutámico, G es glicina, H es histidina, L es leucina, I es isoleucina, K es lisina, M es metionina, F es fenilalanina, P es prolina, S es serina, T es treonina, W es triptófano, Y es tirosina y V es valina. Un guión (-) en una secuencia consenso indica que no hay aminoácidos en la posición especificada. Un signo más (+) en una secuencia consenso indica que cualquier aminoácido puede estar presente en la posición especificada. Por lo tanto, una ventaja en una secuencia consenso en el presente documento indica una posición en la que el aminoácido generalmente no está conservado; una secuencia enzimática homóloga, cuando se alinea con la secuencia consenso, puede tener cualquier aminoácido en la posición "+" indicada. En las posiciones en una secuencia consenso en las que uno de un subconjunto de aminoácidos puede estar presente, se usan las abreviaturas siguientes: B representa que uno de los aminoácidos R, K o H está presente en la posición indicada; J representa que uno de los aminoácidos D o E está presente en la posición indicada; O representa que uno de los aminoácidos I, L o V está presente en la posición indicada; U representa que uno de los aminoácidos S o T está presente en la posición indicada; y X<sub>1</sub> representa que uno de los aminoácidos A, D, R, H, K, S, T, N, Q o Y (o un subconjunto de esos aminoácidos) está presente en la posición indicada. Subconjuntos ilustrativos de X<sub>1</sub>, incluyen X<sub>1</sub>, es A, D, K, S, T, N o Y y X<sub>1</sub>, es S o N. Los aminoácidos específicos en una secuencia codificante de proteínas se identifican por su respectiva abreviatura de una sola letra seguida de la posición del aminoácido en la secuencia codificante de proteínas, en la que 1 corresponde al aminoácido (típicamente metionina) en el extremo N de la proteína. Por ejemplo, E124 en EHD3 natural de *S. cerevisiae* tipo natural se refiere al ácido glutámico en la posición 124 de la metionina en N-terminal EHD3 (es decir, M1). Las sustituciones de aminoácidos (es decir, mutaciones puntuales) se indican identificando el aminoácido mutado (es decir, progenie) después del código de una sola letra y el número en la secuencia codificante de la proteína parental; por ejemplo, E124A en EHD3 de *S. cerevisiae* se refiere a la sustitución de alanina por ácido glutámico en la posición 124 en la secuencia codificante de la proteína EHD3. La mutación también se puede identificar entre paréntesis, por ejemplo EHD3 (E124A). Las mutaciones puntuales múltiples en la secuencia de codificación de proteínas están separadas por una barra invertida (/); por ejemplo, EHD3 E124A/Y125A indica que las mutaciones E124A y Y125A están presentes en la secuencia de codificación de la proteína EHD3. El número de mutaciones introducidas en algunos ejemplos se ha anotado con un guión seguido del número de mutaciones, antes de la identificación entre paréntesis de la mutación (por ejemplo, A5W8H3-1 (E95Q)). Las ID de Uniprot con y sin el guión y el número se usan indistintamente en el presente documento (es

decir, A5W8H3-1 (E95Q) = A5W8H3 (E95Q)).

Como se utiliza en el presente documento, el término "expresa", cuando se usa en relación con un ácido nucleico que codifica una enzima o una enzima en sí misma en una célula, significa que la enzima, que puede ser una enzima endógena o exógena (heteróloga), se produce en la célula. El término "sobreeexpresa", en estos contextos, significa que la enzima se produce a un nivel más alto, es decir, los niveles de la enzima están aumentados, en comparación con el tipo salvaje, en el caso de una enzima endógena. Los expertos en la técnica aprecian que la sobreexpresión de una enzima se puede lograr aumentando la resistencia o cambiando el tipo de promotor utilizado para dirigir la expresión de una secuencia de codificación, aumentando la fuerza del sitio de unión al ribosoma o secuencia Kozak, aumentando la estabilidad de la transcripción del ARNm, alterando el uso de codones y aumentando la estabilidad de la enzima.

Los términos "vector de expresión" o "vector" se refieren a un ácido nucleico y/o una composición que comprende un ácido nucleico que puede introducirse en una célula huésped, por ejemplo, mediante transducción, transformación, o infección, de tal manera que la célula produce ("expresa") ácidos nucleicos y/o proteínas distintas de las nativas de la célula, o de una manera no nativa de la célula, que están contenidas en o codificadas por el ácido nucleico así introducido. Por lo tanto, un "vector de expresión" contiene ácidos nucleicos (generalmente ADN) para su expresión por la célula huésped. Opcionalmente, el vector de expresión puede estar contenido en materiales para ayudar a lograr la entrada del ácido nucleico en la célula huésped, tales como los materiales asociados con recubrimientos de virus, liposomas o proteínas. Los vectores de expresión adecuados para su uso en diversos aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen aquellos en los que una secuencia de ácido nucleico puede ser, o se ha insertado, junto con cualquier elemento operacional preferente o requerido. Por lo tanto, un vector de expresión se puede transferir a una célula huésped y, de forma típica, replicar en el mismo (aunque, también se puede emplear, en algunas realizaciones, vectores no replicables que proporcionan una expresión "transitoria"). En algunas realizaciones, se usa un vector de expresión que se integra en el ADN del cromosoma, mitocondrial o del plásmido. En otras realizaciones, se usa un vector de expresión que se replica de forma extracromosómica. Los vectores de expresión típicos incluyen plásmidos y los vectores de expresión típicamente contienen los elementos operativos requeridos para la transcripción de un ácido nucleico en el vector. Tales plásmidos, así como otros vectores de expresión, se describen en el presente documento o son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los términos "fermento", "fermentativo" y "fermentación" se usan en el presente documento para describir el cultivo de microbios en condiciones para producir productos químicos útiles, incluyendo, pero sin limitaciones, condiciones bajo las cuales el crecimiento microbiano, ya sea aeróbico o anaeróbico, se produce.

El término "heterólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a un material que no es nativo de una célula. Por ejemplo, un ácido nucleico es heterólogo de una célula y también lo es un "ácido nucleico heterólogo" con respecto a esa célula, si al menos uno de los siguientes es verdadero: (a) el ácido nucleico no se encuentra de forma natural en esa célula (es decir, es un ácido nucleico "exógeno"); (b) el ácido nucleico se encuentra de forma natural en una célula huésped dada (es decir, es "endógeno para"), pero el ácido nucleico o el ARN o proteína resultante de la transcripción y traducción de este ácido nucleico se produce o está presente en la célula huésped en una cantidad no natural (por ejemplo, mayor o menor que la presente de forma natural); (c) el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína endógena de una célula huésped pero difiere en la secuencia de la secuencia de nucleótidos endógena que codifica esa misma proteína (que tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos), que normalmente da lugar a la producción de la proteína en mayor cantidad en la célula o, en el caso de una enzima, produce una versión mutante que posee actividad alterada (por ejemplo, mayor o menor o diferente); y/o (d) el ácido nucleico comprende dos o más secuencias de nucleótidos que no se encuentran en la misma relación entre sí en la célula. Como otro ejemplo, una proteína es heteróloga de una célula huésped si se produce por traducción del ARN o el ARN correspondiente se produce por transcripción de un ácido nucleico heterólogo; una proteína también es heteróloga de una célula huésped si es una versión mutada de una proteína endógena y la mutación se introdujo por ingeniería genética.

Los términos "célula huésped" y "microorganismo huésped" se usan de manera intercambiable en el presente documento para hacer referencia a una célula viva que puede ser (o ha sido) transformada a través de la inserción de un vector de expresión. Un microorganismo o célula huésped como se describe en el presente documento puede ser una célula procariota (por ejemplo, un microorganismo del reino Eubacteria) o una célula eucariota. Como apreciarán los expertos en la técnica, una célula procariota carece de un núcleo unido a la membrana, mientras que una célula eucariota tiene un núcleo unido a la membrana.

Los términos "aislado" o "puro" se refieren a material que está sustancialmente, por ejemplo, superior al 50 % o superior al 75 %, o esencialmente, por ejemplo, superior al 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo, por ejemplo, el estado en el que se encuentra de forma natural o el estado en el que existe cuando se produce por primera vez.

Un ácido carboxílico como se describe en el presente documento puede ser una sal, ácido, base o derivado dependiendo de la estructura, el pH y los iones presentes. Los términos "malonato" y "ácido malónico" se usan indistintamente en el presente documento. El ácido malónico también se llama ácido propanodioico (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>; N.º CAS 141-82-2).

El término "compuestos derivados de malonato", como se usa en el presente documento, se refiere a los ésteres de malonato de mono-alquilo, incluidos, por ejemplo y sin limitación, malonato de monometilo (también conocido como malonato de monometilo, n.º CAS 16695-14-0), malonato de monoetilo (también conocido como malonato de monoetilo, n.º CAS 1071-46-1), malonato de mono propilo, malonato de mono-butilo, malonato de mono-terc-butilo (n.º CAS 40052-13-9), y similares; ésteres de malonato de dialquilo, por ejemplo y sin limitación, malonato de dimetilo (n.º CAS 108-59-8), malonato de dietilo (n.º CAS 105-53-3), malonato de dipropilo (n.º CAS 1117-19-7), malonato de dibutilo (n.º CAS 1190-39-2), y similares, y ácido de Meldrum (n.º CAS 2033-24-1). Los compuestos derivados de malonato pueden producirse sintéticamente a partir de malonato y son en sí mismos compuestos valiosos pero también son sustratos útiles en la síntesis química de una serie de otros compuestos valiosos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "ácido nucleico" y sus variaciones serán genéricos para los polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa) y los polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa). "Ácido nucleico" también puede hacer referencia a cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glucósido de una base de purina o pirimidina, y a otros polímeros que contienen esqueletos no nucleotídicos, siempre que los polímeros contengan bases nucleotídicas en una configuración que permita el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, como se encuentra en el ADN y el ARN. Como se utiliza en el presente documento, los símbolos para nucleótidos y polinucleótidos son aquellos recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC (Biochem. 9:4022, 1970). Un "ácido nucleico" también se puede referir en el presente documento con respecto a su secuencia, el orden en que se producen diferentes nucleótidos en el ácido nucleico, como la secuencia de nucleótidos en un ácido nucleico define típicamente su actividad biológica, por ejemplo, como en la secuencia de una región de codificación, el ácido nucleico en un gen compuesto por un promotor y una región codificante, que codifica el producto de un gen, que puede ser un ARN, por ejemplo, un ARNr, ARNt o ARNm, o una proteína (cuando un gen codifica una proteína, tanto el ARNm como la proteína son "productos génicos" de ese gen).

La expresión "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, un sitio de unión al ribosoma y un terminador de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, la secuencia de codificación o región de codificación, en la que la secuencia de control de la expresión dirige o regula de otro modo la transcripción y/o traducción de la secuencia de codificación.

Los términos "opcional" u "opcionalmente", como se usan en el presente documento, significan que la característica o estructura descrita posteriormente puede o no estar presente, o que el acontecimiento o circunstancia descrita posteriormente puede producirse o no, y que la descripción incluye casos en los que la característica o estructura en particular está presente y casos en los que la característica o estructura está ausente, o casos en los que el acontecimiento o circunstancia se produce y casos en los que no.

Como se utiliza en el presente documento, "recombinante" se refiere a la alteración del material genético por intervención humana. Habitualmente, recombinante se refiere a la manipulación de ADN o ARN en una célula o virus o vector de expresión mediante procedimientos de biología molecular (tecnología de ADN recombinante), incluyendo la clonación y la recombinación. Recombinante también puede hacer referencia a la manipulación de ADN o ARN en una célula o virus mediante mutagénesis aleatoria o dirigida. Una célula o ácido nucleico "recombinante" se puede describir típicamente con referencia a cómo se diferencia de un homólogo natural (el "tipo salvaje"). Además, se entiende que cualquier referencia a una célula o ácido nucleico que haya sido "modificado por ingeniería" o "modificado" y las variaciones de esos términos hace referencia a una célula o ácido nucleico recombinante.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "biosensor del factor de transcripción" se refiere a un sistema para detectar una sustancia, por ejemplo, malonato, activando la expresión de un gen "marcador" o "indicador" en el que la expresión del gen indicador está mediada por un factor de transcripción que es capaz de unirse a un promotor y activar la transcripción al unirse a esa sustancia, por ejemplo, malonato. Por ejemplo, el malonato se puede unir a un factor de transcripción (por ejemplo, MdcY) y activar la transcripción a partir de un promotor (por ejemplo, P<sub>MdcL</sub>). Un "factor de transcripción de malonato" es un factor de transcripción que, cuando está unido al malonato, puede activar un promotor. Por lo tanto, MdcY es un factor de transcripción de malonato.

Los términos "transducir", "transformar", "transfectar", y variaciones de los mismos, como se usa en el presente documento, se refieren a la introducción de uno o más ácidos nucleicos en una célula. A efectos prácticos, la célula debe mantener o replicar de manera estable durante un período de tiempo suficiente para permitir que la función o funciones o producto o productos que codifica se expresen para que la célula se denomine "transducida", "transformada" o "transfectada". Como apreciarán los expertos en la técnica, el mantenimiento o la replicación estable de un ácido nucleico puede tener lugar mediante la incorporación de la secuencia de ácidos nucleicos en el ADN cromosómico celular, por ejemplo, el genoma, como se produce por integración cromosómica, o por replicación extracromosómica, como se produce con un plásmido de replicación libre. Un virus se puede mantener o replicar de forma estable cuando es "infeccioso": cuando transduce un microorganismo huésped, se replica y (sin el beneficio de ningún virus o vector complementario) propaga vectores de expresión de la progenie, por ejemplo, virus, del mismo tipo que el vector de expresión de transducción original a otros microorganismos, en el que los vectores de expresión de la progenie poseen la misma capacidad de reproducirse.

## Sección 2: Enzimas malonil-CoA hidrolasa

De acuerdo con un aspecto de la invención, el malonato se produce a través de la acción de una malonil-CoA hidrolasa que cataliza la conversión de malonil-CoA en malonato. Hasta la fecha, no se ha identificado ningún gen de la malonil-CoA hidrolasa de tipo salvaje, aunque la presencia de una pequeña cantidad de malonato en los medios de fermentación de cepas no diseñadas por ingeniería indica que puede existir una enzima de tipo salvaje con esta actividad. La presente invención proporciona varios genes que son homólogos a los genes de tipo salvaje que se han mutado para conferir actividad malonil-CoA hidrolasa. La célula huésped que produce la malonil-CoA hidrolasa es una célula huésped recombinante; en muchas realizaciones, la célula huésped ha sido modificada genéticamente para comprender ácido o ácidos nucleicos que codifican la enzima o enzimas malonil-CoA hidrolasa que catalizan la hidrólisis de malonil-CoA en malonato. En algunas realizaciones, la célula huésped recombinante es un eucariota. En varias realizaciones, el eucariota es una cepa de levadura seleccionada de los géneros de ejemplo no limitantes: *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Komagataella*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodospodium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* o *Yarrowia*. Los expertos en la materia reconocerán que estos géneros abarcan ampliamente levaduras, incluyendo las que se distinguen como levadura oleaginosas. En algunas realizaciones, la célula huésped es *Saccharomyces cerevisiae*. En otras realizaciones, la célula huésped es *Pichia kudriavzevii*. En otras realizaciones de la invención, la célula huésped eucariota es un hongo o algas. En aún otras realizaciones, la célula huésped recombinante es un procariota seleccionado de los géneros de ejemplo no limitantes: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* y *Streptomyces*. En algunas realizaciones, la célula huésped es *E. coli*.

La presente invención resulta en parte del descubrimiento de que varias acil-CoA hidrolasas y transacilasas pueden diseñarse para que tengan actividad malonil-CoA hidrolasa y, por lo tanto, ser útiles para la producción biológica de malonato. Los ejemplos no limitantes de acil-CoA hidrolasas adecuadas para la modificación de la hidrólisis de malonil-CoA incluyen cualquiera de los del grupo que consiste en 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.4), 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.4), acetoacetil-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.11), metilmalonil-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.17), propionil-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.18), succinil-CoA hidrolasas (EC 3.1.2.3) y malonil-CoA:ACP transacilasas (EC 2.3.1.39) mutadas como se indica en el presente documento para que tengan actividad malonil-CoA hidrolasa.

En algunas realizaciones, la malonil-CoA hidrolasa utilizada para producir malonato de acuerdo con la invención es una EHD3 acil-CoA hidrolasa de *S. cerevisiae* mutada (véase la SEQ ID NO: 1 para la secuencia de aminoácidos de EHD3 de tipo salvaje). Uno de estos mutantes con especificidad de sustrato alterado es el mutante E124V (véase Rouhier, "Characterization of YDR036C from *Saccharomyces cerevisiae*". Dissertation, Universidad de Miami, Universidad de Miami y OhioLINK (2011)), que, aún notificado anteriormente, no se indicó que tenía actividad malonil-CoA hidrolasa. En algunas realizaciones de la invención, una célula huésped de *E. coli* que expresa el mutante E124V se usa para producir malonato, que después se purifica a partir de la célula o caldo de fermentación. En otras realizaciones de la invención, una célula de levadura que expresa el mutante E124V se usa para producir malonato de acuerdo con la invención. En aún otra realización, una célula de levadura oleaginosas que expresa el mutante E124V se usa para producir malonato de acuerdo con la invención.

Los intentos anteriores de producir el mutante E124A de EHD3 dieron como resultado la muerte celular tras la inducción de la expresión de proteínas a partir de un vector de expresión pET28a; la proteína no pudo ser purificada (véase Rouhier, anteriormente). La presente invención proporciona vectores de expresión para el mutante E124A que pueden usarse en células huésped de *E. coli*, haciéndolos capaces de producir malonato. Estos vectores de expresión de *E. coli* se caracterizan porque, con respecto al vector pET28a de Rouhier, el mutante E124A se produce a un nivel menor no tóxico. Esto se consigue, por ejemplo, empleando vectores de expresión con un número de copias inferior o un promotor más débil que el utilizado por Rouhier. Un experto en la técnica también apreciará que la traducción se puede modular por la afinidad del sitio de unión al ribosoma (RBS), o secuencia de Kozak, para el ribosoma. Por lo tanto, también se puede emplear una secuencia de RBS o Kozak más débil para reducir la expresión génica. Ejemplos de vectores de expresión de menor número de copia incluyen, pero sin limitaciones, vectores de expresión de origen pSC101, vectores de expresión de origen p15a y vectores de expresión que se integran en el ADN cromosómico. Los ejemplos de promotores más débiles que el promotor T7 utilizado por Rouhier incluyen los promotores  $P_{LacO1}$ ,  $P_{TRC}$  y  $P_{BAD}$ . En algunas realizaciones, el vector tiene un origen de replicación pSC101. En otras realizaciones, el promotor utilizado para la expresión de la secuencia de codificación mutante de EHD3 E124A es el promotor  $P_{LacO1}$ . Además, la presente invención proporciona vectores para células huésped de levadura que codifican la expresión del mutante E124A. Los vectores de expresión EHD3 E124A de *S. cerevisiae* modificados genéticamente de la invención se pueden usar *in vivo* para la producción de malonato en *E. coli* y *S. cerevisiae*, y los procedimientos de la invención proporcionan medios para la posterior purificación de malonato a partir de caldo de fermentación estas cepas, y la conversión sintética de malonato en compuestos derivados de moléculas pequeñas.

También se desvela el mutante E124S de EHD3 para uso como malonil-CoA hidrolasa, vectores para expresar este mutante y células huésped que expresan este mutante y producen malonato (véase el Ejemplo 31). La EHD3 de *S. cerevisiae* de tipo salvaje cataliza la hidrólisis de 3-hidroxiisobutiril-CoA (3HPA-CoA) y 3-hidroxiisobutiril-CoA (3HIBA-CoA). Se prevé que E124 interactúa con el resto hidroxilo terminal en 3HPA-CoA, estabilizando el sustrato en el sitio activo de EHD3 (véase Rouhier, anteriormente). Ciertos aspectos de la presente invención surgen

del descubrimiento de que mutaciones puntuales específicas E124 aumentan la hidrólisis enzimática de malonil-CoA, produciendo malonato. La mutación de E124 a un aminoácido nucleofílico (por ejemplo, S o T), aminoácido básico (por ejemplo, H, K o R), o aminoácido amida (por ejemplo, N o Q) mejora la unión de malonil-CoA en el sitio activo de EHD3 sobre 3-hidroxiisobutiril-CoA y aumenta la producción de malonato (en relación con la enzima homóloga no mutada). Las mutaciones E124S, E124T, E124N, E124Q, E124H, E124K y E124R también disminuyen la producción de subproductos (por ejemplo, acetato, propionato, isobutirato y succinato) debido a la disminución de la hidrólisis de las moléculas de acil-CoA de la célula huésped endógena. La mutación puntual E124S coloca un resto hidroxilo en una posición que estimula el enlace de hidrógeno entre el resto de serina y el grupo carboxilato terminal de la malonil-CoA. La mutación puntual E124Q coloca el grupo amida de la glutamina en una posición cerca del grupo carboxilato terminal de la malonil-CoA. La mutación puntual E124K coloca al grupo amina de la lisina en una posición que estimula el enlace de hidrógeno entre el resto de lisina y el grupo carboxilato terminal de la malonil-CoA. En contraste con las mutaciones puntuales nucleofílicas, amidas y básicas E124 descritas anteriormente, las mutaciones E124A y E124V eliminan la presencia de un aminoácido cargado en la posición 124; estas mutaciones eliminan los enlaces de hidrógeno entre el carboxilato terminal en el malonato y la cadena lateral de 124 aminoácidos de EHD3 y abren el sitio activo de EHD3 a la actividad promiscua, aumentando la formación indeseable de subproducto y disminuyendo la producción de malonato.

En algunas realizaciones de la invención, una célula huésped de *E. coli* que expresa el mutante E124S se usa para producir malonato. En otras realizaciones de la invención, una célula huésped de levadura que expresa el mutante E124S se usa para producir malonato. En otras realizaciones, una célula huésped de levadura oleaginosa que expresa el mutante E124S se utiliza para producir malonato. En algunas realizaciones de la invención, una célula huésped de *E. coli* que expresa el mutante E124Q se usa para producir malonato. En otras realizaciones de la invención, una célula huésped de levadura que expresa el mutante E124Q se usa para producir malonato. En otras realizaciones, una célula huésped de levadura oleaginosa que expresa el mutante E124Q se utiliza para producir malonato. En algunas realizaciones de la invención, una célula huésped de *E. coli* que expresa el mutante E124K se usa para producir malonato. En otras realizaciones de la invención, una célula huésped de levadura que expresa el mutante E124K se usa para producir malonato. En otras realizaciones, una célula huésped de levadura oleaginosa que expresa el mutante E124K se utiliza para producir malonato. En algunas realizaciones de la invención, una célula huésped de *E. coli* que expresa el mutante E124H se usa para producir malonato. En otras realizaciones de la invención, una célula huésped de levadura que expresa el mutante E124H se usa para producir malonato. En otras realizaciones de la invención, una célula huésped de levadura oleaginosa que expresa el mutante E124H se utiliza para producir malonato. En algunas realizaciones de la invención, una célula huésped de *E. coli* que expresa el mutante E124R se usa para producir malonato. En otras realizaciones de la invención, una célula huésped de levadura que expresa el mutante E124R se usa para producir malonato. En otras realizaciones de la invención, una célula huésped de levadura oleaginosa que expresa el mutante E124R se utiliza para producir malonato. En otras realizaciones, se usa una célula huésped recombinante que expresa una mutación puntual del aminoácido nucleofílico EHD3 E124 (es decir, E124S o E124T) para producir malonato. En otras realizaciones, una célula huésped recombinante que expresa una mutación puntual del aminoácido básico EHD3 E124 (es decir, E124H, E124K o E124R) se utiliza para producir malonato. En otras realizaciones, se usa una célula huésped recombinante que expresa una mutación puntual de aminoácido amida EHD3 E124 (es decir, E124N o E124Q) para producir malonato.

También se desvela un EHD3 mutado que comprende un sitio activo mutado, vectores para expresar el mutante y células huésped que expresan el mutante y producen malonato. Surgieron ciertos aspectos de la presente invención, en parte, a partir del descubrimiento de que los aminoácidos específicos (es decir, F121 y F177) son importantes para la unión del sustrato acil-CoA y la introducción de mutaciones puntuales específicas aumenta la hidrólisis de malonil-CoA y la producción de malonato. La introducción de la mutación F121I o F121L aumenta el acceso del malonil-CoA al sitio activo. De forma similar, la introducción de la mutación F177I o F177L aumenta el acceso de la malonil-CoA al sitio activo. Una o más mutaciones puntuales en las posiciones de aminoácidos F121 o F177 se pueden introducir solas o junto con una mutación puntual E124. En varias realizaciones, se introduce una mutación puntual F121 y/o F177 junto con una mutación puntual E124. En algunas realizaciones, se usa una célula huésped recombinante que expresa un mutante EHD3 F121I o F121L para producir malonato. En otras realizaciones, se usa una célula huésped recombinante que expresa un mutante EHD3 F177I o F178L para producir malonato. En estas realizaciones, la célula huésped recombinante puede ser, sin limitación, una célula huésped *E. coli* o levadura, incluyendo *S. cerevisiae* u otra levadura.

También se desvela la EHD3 mutada que comprende una secuencia de direccionamiento mitocondrial mutada, vectores para expresar el mutante y células huésped que expresan el mutante y producen malonato. En un huésped de *S. cerevisiae*, la EHD3 de tipo salvaje se localiza en las mitocondrias. La malonil-CoA se encuentra tanto en la mitocondria como en el citosol; La hidrólisis catalizada por EHD3 de malonil-CoA citosólica requiere la localización de un EHD3 en el citosol. Ciertos aspectos de la presente invención surgieron del descubrimiento de que las mutaciones de la secuencia de direccionamiento mitocondrial EHD3 pueden aumentar la producción de malonato. Los aminoácidos EHD3 importantes para la orientación mitocondrial incluyen R3, K7, K14, K18 y R22, y la mutación de uno o más de estos aminoácidos básicos en un aminoácido hidrofóbico (es decir, A o V) anula la orientación mitocondrial. En algunas realizaciones, se usa un huésped recombinante que comprende un EHD3 que consiste en una o más mutaciones a A o V en los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en R3, K7, K14, K18 y R22

para producir malonato. En algunas realizaciones, el huésped recombinante es una cepa de levadura. En otras realizaciones, el huésped es *S. cerevisiae*. En aún realizaciones adicionales, la célula huésped recombinante contiene una o más copias de un EHD3 con la secuencia de direccionamiento mitocondrial inalterada (es decir, de tipo salvaje) y una o más copias de un EHD3 con la secuencia de direccionamiento mitocondrial mutada. Ejemplos adicionales de secuencias de direccionamiento mitocondrial útiles en este aspecto de la invención son: WT COX4, SynA1, SynA2, Syn B1 y Syn B2, como indican para otras aplicaciones Allison & Schatz (Allison & Schatz (1986) PNAS 83:9011-9015). En realizaciones adicionales de la invención, la señal de direccionamiento peroxisomal (por ejemplo, PTS1, PTS2), que con mayor frecuencia contiene un motivo Ser-Lys-Leu, se fusiona con el extremo C de la malonil-CoA hidrolasa para dar lugar a la localización de esta proteína en el peroxisoma.

Por lo tanto, en una realización de la invención, la célula huésped recombinante comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una EHD3 mutante de *S. cerevisiae* que produce un aumento de la producción de malonato en relación con las células huésped que no comprenden la EHD3 mutante. En algunas realizaciones, el EHD3 mutante se expresa de manera heteróloga en *E. coli*. En otras realizaciones, el EHD3 mutante se expresa de forma heteróloga en *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, el EHD3 mutante se expresa de forma heteróloga en una células de levadura oleaginoso. En algunas realizaciones, el EHD3 mutante contiene una mutación puntual en la posición E124. En algunas realizaciones, la mutación puntual en el resto E124 es E124A o E124V. En algunas realizaciones, la mutación puntual en E124 es E124S o E124T. En algunas realizaciones, la mutación puntual en E124 es E124S. En algunas realizaciones, la mutación puntual en E124 es un aminoácido básico seleccionado del grupo que consiste en E124H, E124K y E124R. En algunas realizaciones, la mutación puntual en E124 es E124H. En algunas realizaciones, la mutación puntual en E124 es E124K. En algunas realizaciones, la mutación puntual en E124 es E124R. En algunas realizaciones, la mutación puntual en el resto E124 es E124N o E124Q. En algunas realizaciones, la mutación puntual en el resto E124 es E124Q. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos EHD3 seleccionados del grupo que consiste en F121 y F177 se mutan a I o L. En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos EHD3 seleccionados del grupo que consiste en R3, K7, K14, K18 y R22 están mutados a A o V.

En otra realización de la invención, una enzima que no sea, o además de, EHD3 se utiliza como malonil-CoA hidrolasa para producir malonato de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, YciA de *Haemophilus influenzae* se expresa de manera heteróloga en un huésped heterólogo para producir malonato de acuerdo con la invención (véase Zhuang y col., *Biochemistry* 47: 2789-2796 (2008)). En otras realizaciones, la malonil-CoA hidrolasa es una acil-CoA hidrolasa endógena de *Rattus norvegicus* (véase el Kovachy y col., *J. Biol. Chem.* 258:11415-11421 (1983)). En otras realizaciones, la malonil-CoA hidrolasa es la acil-CoA hidrolasa de la fracción proteica mitocondrial del tejido adiposo marrón de *Mesocricetus auratus* (véase Alexson y col., *J. Biol. Chem.* 263:13564-13571 (1988)).

Por lo tanto, se pueden usar acil-CoA hidrolasas distintas de, o además de, EHD3 (de *S. cerevisiae* o enzimas homólogas de otros organismos) para la síntesis biológica de malonato en un huésped recombinante. En algunas realizaciones, el huésped recombinante es *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, el huésped recombinante es *E. coli*. En otras realizaciones, el huésped recombinante es una levadura distinta de *S. cerevisiae* como se describe con detalle adicional a continuación. En varias realizaciones, el huésped se modifica para expresar una enzima mutada seleccionada del grupo que consiste en EHD3 de *S. albicans*, HIBCH de *H. sapiens* (UniProt: 6NVY1), CHY1 de *A. thaliana* (UniProt: Q9LJK1), HIBCH de *R. norvegicus* (UniProt: Q5XIE6), HIBCH de *M. musculus* (UniProt: Q8QZS1), HIBCH de *G. gallus* (UniProt: Q5ZJ60), HIBCH de *B. taurus* (UniProt: Q2HJ73), HIBCH de *D. rerio* (UniProt: Q58EB4), Bch de *B. cereus*, Hich de *P. aeruginosa*, YciA de *E. coli*, YciA de *H. influenzae*, ACOT4 de *M. musculus*, ACOT8 de *M. musculus*, SARI\_01218 de *S. enterica*, K1 de *A. pernix*, Chut02003666 de *C. hutchinsonii*, P2 SS02287 de *S. solfataricus*, DSM 639 Saci\_0145 de *S. acido- caldarius*, PAE3404 de *P. aerophilum*, cepa IM2, CG1635 de *D. melanogaster*, DSM 2380 Pcar\_1366 de *P. carbinolicus*, 2CP-C 110 de *A. dehalogenans*, ACOT9 de *G. gallus* y MGC114623 de *X. laevis*.

Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar una o múltiples acil-CoA hidrolasas mutadas adecuadamente de acuerdo con la invención para convertir malonil-CoA en malonato en una célula huésped. Además, se pueden usar acil-CoA hidrolasas distintas de las descritas específicamente en el presente documento en forma mutada o expresadas de forma heteróloga, y los expertos en la técnica entenderán que, a la vista de esta descripción, se pueden identificar otras enzimas apropiadas. modificado, y expresado para lograr la actividad de malonil-CoA hidrolasa deseada como se describe en el presente documento.

### Secuencias consenso

Las malonil-CoA hidrolasas de la invención incluyen aquellas que son homólogas a las secuencias consenso proporcionadas por la invención. Como se ha indicado anteriormente, cualquier enzima sustancialmente homóloga a una enzima descrita específicamente en el presente documento puede usarse en una célula huésped de la invención. Una enzima es homóloga a otra (la "enzima de referencia") cuando exhibe la misma actividad de interés y se puede usar para fines sustancialmente similares. De manera general, las enzimas homólogas comparten una identidad de secuencia sustancial. Los conjuntos de enzimas homólogas generalmente poseen uno o más aminoácidos específicos que se conservan en todos los miembros de la clase de proteínas de secuencia consenso.

El porcentaje de identidad de secuencia de una enzima en relación con una secuencia consenso se determina

alineando la secuencia de la enzima con la secuencia consenso. Los expertos en la técnica reconocerán que varios algoritmos de alineación de secuencias son adecuados para alinear una enzima con una secuencia consenso. Véase, por ejemplo, Needleman, SB, y col., "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins." *Journal of Molecular Biology* 48 (3): 443-53 (1970). Siguiendo la alineación de la secuencia de la enzima en relación con la secuencia consenso, el porcentaje de posiciones en las que la enzima posee un aminoácido (o guión) descrito por la misma posición en la secuencia consenso determina el porcentaje de identidad de secuencia. Cuando un aminoácido degenerado (es decir, B, J, O, U, "+") está presente en una secuencia consenso, cualquiera de los aminoácidos descritos por el aminoácido degenerado puede estar presente en la enzima en la posición alineada para que la enzima sea idéntica a la secuencia consenso en la posición alineada. Cuando un guión está presente en una secuencia consenso, la enzima no debe tener un aminoácido presente en la posición alineada para que la enzima sea idéntica a la secuencia consenso en la posición alineada.

Se desvelan secuencias consenso útiles para identificar y construir malonil-CoA hidrolasas. En varias realizaciones, estas secuencias consenso de la malonil-CoA hidrolasa contienen restos de aminoácidos del sitio activo que se cree que son necesarios (aunque la invención no está limitada por ninguna teoría del mecanismo de acción) para la formación de un orificio de oxianión responsable de la estabilización del anión enolato intermedio derivado de un sustrato de malonil-CoA, así como los restos de aminoácidos importantes para la unión de malonil-CoA, como se describe a continuación. Una enzima malonil-CoA hidrolasa englobada por una secuencia consenso proporcionada en el presente documento tiene una actividad enzimática que es idéntica, o esencialmente idéntica, o al menos sustancialmente similar con respecto a la capacidad para hidrolizar el malonil-CoA a la de una de las enzimas ilustradas como ejemplo en el presente documento. Una enzima malonil-CoA hidrolasa se puede encontrar en la naturaleza o, más típicamente, es un mutante diseñado por ingeniería genética de una enzima de tipo salvaje modificada de acuerdo con la invención para que tenga actividad malonil-CoA hidrolasa. Una enzima malonil-CoA hidrolasa puede identificarse o construirse a partir de otra enzima mutando la secuencia de la otra enzima para crear una secuencia abarcada por una secuencia consenso en el presente documento; por tanto, si una enzima comparte una homología sustancial con una secuencia consenso en el presente documento pero tiene un nivel subóptimo de actividad malonil-CoA hidrolasa, incluyendo ausencia de la misma, de acuerdo con la invención, está mutada para adecuarse a una secuencia consenso proporcionada en el presente documento para proporcionar una malonil-CoA hidrolasa de la invención.

Se desvelan cuatro secuencias consenso de la malonil-CoA hidrolasa: (i) malonil-CoA hidrolasa basada en EHD3 EC 3.1.2.4 (SEQ ID NO: 7), (ii) malonil-CoA hidrolasa basada en *Bacillus* EC 3.1.2.4 (SEQ ID NO: 8), (iii) malonil-CoA hidrolasa basada en *Pseudomonas* EC 3.1.2.4 (SEQ ID NO: 9), y (iv) malonil-CoA hidrolasa basada tanto en *Bacillus* como en *Pseudomonas* EC 3.1.2.4 ((SEQ ID NO:10). Las secuencias consenso proporcionan una secuencia de aminoácidos en la que cada posición identifica el aminoácido (si se identifica un aminoácido específico) o un subconjunto de aminoácidos (si se identifica una posición como variable) con mayor probabilidad de encontrarse en una posición específica en una malonil-CoA hidrolasa de esa clase. Los expertos en la técnica reconocerán que los aminoácidos fijos y los aminoácidos conservados en estas secuencias consenso son idénticos (en el caso de los aminoácidos fijos) o compatibles con (en el caso de los aminoácidos conservados) con la secuencia o secuencias de tipo salvaje en que se basa la secuencia consenso. Un guión en una secuencia consenso indica que se pueden encontrar enzimas adecuadas para la mutación en la naturaleza que pueden tener un aminoácido adicional en la ubicación del guión en la secuencia, pero típicamente no hay aminoácidos presentes en la ubicación de un guión.

#### ***Secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa basada en las enzimas EHD3 EC 3.1.2.4***

Se desvela una secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa basada en las enzimas EHD3 EC 3.1.2.4 (SEQ ID NO: 7) y en varias realizaciones, las malonil-CoA hidrolasas adecuadas para su uso en los procedimientos de la invención tienen al menos un 63 % de identidad con esta secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa. En varias realizaciones, las enzimas adecuadas para la mutación del resto clave de ácido glutámico en X<sub>1</sub> de acuerdo con los procedimientos de la invención para conferir actividad malonil-CoA hidrolasa tienen un 65 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % o más de identidad con la SEQ ID NO: 7. Las proteínas que tienen una homología significativa con esta secuencia consenso incluyen UniProt ID: C5DE94 (63 % de identidad), ID UniProt: Q6CJH2 (64 % de identidad), ID UniProt: G2WAE2 (66 % de identidad), ID UniProt: J8Q6P9 (66 % de identidad), ID UniProt: G8C0H0 (68 % de identidad), ID UniProt: C5DX08 (68 % de identidad), ID UniProt: P28817 (69 % de identidad), ID UniProt: A7TTD5 (69 % de identidad), ID UniProt: J7S9J9 (70 % de identidad), ID UniProt: Q6FM09 (71 % de identidad), ID UniProt: I2H4L2 (71 % de identidad), ID UniProt: H2AME2 (73 % de identidad), ID UniProt: G8ZTJ4 (77 % de identidad), ID UniProt: G0W4I8 (77 % de identidad), ID UniProt: GOV818 (78 % de identidad) e ID UniProt: J5S5X3 (79 % de identidad). En algunas realizaciones, una malonil-CoA hidrolasa con una identidad igual o superior al 63 % con la secuencia consenso SEQ ID NO: 7 se expresa en una célula huésped recombinante y se usa para producir malonato de acuerdo con la invención.

En enzimas mutantes y de tipo salvaje homólogas a esta secuencia consenso (SEQ ID NO: 7), los aminoácidos que están altamente conservados son V101, R110, L114, R116, K119, L120, N121, A122, L123, L135, E137, Y138, K140, S141, S151, R156, C159, G161, G162, D163, V164, A168, F185, E188, Y189, S190, N192, A196, T197, K200, M206, G208, I209, T210, M211, G212, G213, G214, V215, G216, H220, P222, F223, R224, T227, E228, T230, M234, P235, E236, D238, I239, G240, F242, P243, D244, V245, F249, P252, Q263, Y267, L268, T271, G272, G277, G284, S287, H288, Y289, L298, R301, L302, E304, E333, F334, L352, V354, I355, F359, L374, F391, L399,

K402, S403, S406, N417, D429, L430, T432, A433, E449, F450, K457, L458, K461, W468, L494, T502, Y506, P507, L514, P515 y K561. En varias realizaciones, las enzimas malonil-CoA hidrolasas homólogas a esta secuencia consenso (SEQ ID NO: 7) contienen al menos el 25 % de estos aminoácidos conservados, a menudo la mayoría (más del 50 %) de estos aminoácidos conservados, y en ocasiones todos estos aminoácidos conservados.

5 Algunos aminoácidos en esta secuencia consenso (SEQ ID NO: 7) son esenciales para la actividad y se conservan en todos los miembros de la clase. Las enzimas malonil-CoA hidrolasas abarcadas por la secuencia consenso basada en EHD3 EC 3.1.2.4 contienen seis restos del sitio activo importantes para la actividad hidrolasa: (i) tres restos de aminoácidos del sitio activo (G161, G162, G213) en la secuencia consenso que se considera necesaria (aunque la invención no está limitada por ninguna teoría de mecanismo de acción) para la formación de un orificio de oxianión responsable de estabilizar el anión intermedio enolato derivado del sustrato malonil-CoA; (ii) dos restos de aminoácidos (E236, D244) de la secuencia consenso necesaria para la hidrólisis de acil-CoA; y (iii) un resto de aminoácido en la posición 188 (de la SEQ ID NO: 7) que se cree que es necesario para la unión del sustrato malonil-CoA. Por tanto, de estos seis restos, cinco están presentes en la secuencia consenso (SEQ ID NO: 7) y en todas las malonil-CoA hidrolasas abarcadas por esa secuencia, y el sexto, en la posición 188 (aminoácido X<sub>1</sub>, en la consenso) se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos polares o con carga positiva (R, H, K, S, T, N, Q, Y), así como A y D, para proporcionar una malonil-CoA hidrolasa de la invención capaz de producir malonato en una célula huésped recombinante. Los seis restos esenciales de la secuencia consenso (G161, G162, G213, E236, D244, X<sub>1</sub>188) corresponden a G99, G100, G149, E172, D180 y E124 (típicamente mutados a X<sub>1</sub>), respectivamente, en EHD3 de *S. cerevisiae* utilizada para ilustrar la invención en el ejemplo 31.

#### 20 **Secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa basada en las enzimas *Bacillus* EC 3.1.2.4**

Se desvela una secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa (SEQ ID NO: 8) basada en las enzimas *Bacillus* EC 3.1.2.4, y en varias realizaciones, las malonil-CoA hidrolasas adecuadas para su uso en los procedimientos de la invención tienen al menos un 86 % de identidad con esta secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa. En varias realizaciones, las enzimas adecuadas para la mutación del resto de ácido glutámico clave a X<sub>1</sub> de acuerdo con los procedimientos de la invención para conferir actividad malonil-CoA hidrolasa tienen una identidad del 90 % o del 95 % o más, con la SEQ ID NO: 8. Las proteínas que tienen una homología significativa con esta secuencia consenso incluyen UniProt ID: C2TX63 (92 % de identidad), ID UniProt: C2UV40 (91 % de identidad), ID UniProt: C2QBT2 (93 % de identidad), ID UniProt: C2XTU0 (93 % de identidad), ID UniProt: C2PVQ0 (93 % de identidad), ID UniProt: C3A5N3 (93 % de identidad), ID UniProt: C2SJV4 (93 % de identidad), ID UniProt: C2Z7U1 (92 % de identidad), ID UniProt: C2VTI4 (97 % de identidad), ID UniProt: B3Z9Y3 (97 % de identidad), ID UniProt: B7JNH7 (97 % de identidad), ID UniProt: Q63BK8 (97 % de identidad), ID UniProt: B0Q3Q4 (97 % de identidad), ID UniProt: B0AQX0 (97 % de identidad), ID UniProt: B3YSW2 (97 % de identidad), ID UniProt: C2NHG5 (97 % de identidad), ID UniProt: B3ZIZ8 (97 % de identidad), ID UniProt: C2QSV2 (97 % de identidad), ID UniProt: C3C255 (97 % de identidad), ID UniProt: B5UZZ1 (96 % de identidad), ID UniProt: C2MKL7 (95 % de identidad), ID UniProt: B9IZZ9 (95 % de identidad), ID UniProt: F0PNG8 (95 % de identidad), ID UniProt: Q738L0 (97 % de identidad), ID UniProt: C2PEV7 (95 % de identidad), ID UniProt: C2YRH7 (96 % de identidad), ID UniProt: Q4MU30 (95 % de identidad), ID UniProt: Q81DR3 (96 % de identidad), ID UniProt: C2W7W8 (89 % de identidad) e ID UniProt: A7GPH6 (86 % de identidad). En varias realizaciones, una malonil-CoA hidrolasa con una identidad igual o superior al 86 % con la secuencia consenso SEQ ID NO: 8 se expresa en una célula huésped recombinante y se usa para producir malonato de acuerdo con la invención. Las secuencias para B9IZZ9 (SEQ ID NO: 46), C3ALI3 (SEQ ID NO: 47), F0PNG8 (SEQ ID NO: 49), Q63BK8 (SEQ ID NO: 51) y Q81DR3 (SEQ ID NO: 52) que contienen X<sub>1</sub> en la posición del resto de ácido glutámico clave que está mutado de acuerdo con la invención para conferir actividad malonil-CoA hidrolasa se proporcionan en el listado de secuencias.

45 En las enzimas mutantes y de tipo salvaje homólogas a esta secuencia consenso (SEQ ID NO: 8), los aminoácidos que están altamente conservados son M1, T2, E3, V5, L6, F7, S8, G13, V14, A15, I17, T18, L19, N20, R21, P22, K23, A24, L25, N26, S27, L28, S29, Y30, M32, L33, I36, G37, K39, L40, K41, E42, W43, E44, I49, I52, V53, L54, K55, G56, A57, G58, K60, G61, F62, C63, A64, G65, G66, D67, I68, K69, T70, L71, Y72, E73, A74, R75, S76, N77, E78, A80, L81, Q82, A84, E85, F87, F88, E90, E91, Y92, I94, D95, T96, Y99, Y101, K103, P104, I105, I106, A107, C108, L109, D110, G111, I112, V113, M114, G115, G116, G117, V118, G119, L120, T121, N122, G123, A124, R127, I128, V129, T130, T133, K134, W135, A136, M137, P138, E139, M140, N141, I142, G143, F144, F145, P146, D147, V148, G149, A150, A151, Y152, F153, L154, N155, A157, P158, G159, G162, V165, A166, L167, A169, L172, K173, A174, D176, V177, L178, I180, A182, A183, D184, L192, F195, L196, W204, V210, L214, K215, L231, E236, H241, F242, E248, I250, I251, S253, L254, E255, F261, L269, L270, S271, K272, S273, P274, S276, L277, K278, V279, T280, L281, K282, Q283, G287, K290, S291, E293, C295, F296, A297, T298, D299, L300, L302, A303, K304, N305, F306, M307, R308, H309, D311, F312, F313, E314, G315, V316, R317, S318, V320, D322, K323, D324, Q325, N326, P327, Y329, K330, Y331, D336, V337, V342, N343, F345, F346, L348 y L349. En varias realizaciones, las enzimas malonil-CoA hidrolasas homólogas a esta secuencia consenso (SEQ ID NO: 8) contienen al menos el 25 % de estos aminoácidos conservados, a menudo la mayoría (más del 50 %) de estos aminoácidos conservados, y en ocasiones todos estos aminoácidos conservados.

60 Algunos aminoácidos en esta secuencia consenso (SEQ ID NO: 8) son esenciales para la actividad y se conservan en todos los miembros de la clase. Las enzimas malonil-CoA hidrolasas comprendidas en la secuencia consenso basada en *Bacillus* EC 3.1.2.4 contienen seis restos de sitios activos importantes para la actividad hidrolasa: (i) tres

restos de aminoácidos del sitio activo (G65, G66, G116) de la secuencia consenso que se considera necesaria (aunque la invención no está limitada por ninguna teoría del mecanismo de acción) para la formación de un orificio de oxianión responsable de la estabilización del anión intermedio enolato derivado del sustrato malonil-CoA; (ii) dos restos de aminoácidos (E139, D147) de la secuencia consenso necesaria para la hidrólisis de acil-CoA; y (iii) un aminoácido mutado (X<sub>1</sub>91) (de la SEQ ID NO: 8) que se cree que es necesario para la unión del sustrato malonil-CoA. Por tanto, de estos seis restos, cinco están presentes en la secuencia consenso (SEQ ID NO: 8) y en todas las malonil-CoA hidrolasas abarcadas por esa secuencia, y el sexto, X<sub>1</sub>91 es necesario para proporcionar una malonil-CoA hidrolasa de la invención capaz de producir malonato en una célula huésped recombinante. Los seis restos esenciales de la secuencia consenso (G65, G66, G116, E139, D147, X<sub>1</sub>91) corresponden a G65, G66, G116, E139, D147 y E91 (típicamente mutados a X<sub>1</sub>), respectivamente, en *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus* (cepa YBT-020) F0PNG8 utilizado para ilustrar la invención en el ejemplo 31 (véase la SEQ ID NO: 49 que contiene la mutación E91S).

Ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas para la hidrólisis de malonil-CoA homólogas a la secuencia consenso (SEQ ID NO: 8) y codificadas por ácidos nucleicos clonados o sintetizados proporcionados por la invención incluyen enzimas mutantes que contienen al menos una mutación ilustrada por el grupo de enzimas mutantes que consisten en *Bacillus cereus* (cepa Q1) B9IZZ9 (E91S), B9IZZ9 (E91A), B9IZZ9 (E91H), B9IZZ9 (E91K), B9IZZ9 (E91R), B9IZZ9 (E91Q), B9IZZ9 (E91T), B9IZZ9 (E91N), B9IZZ9 (E91Y), B9IZZ9 (E91D); *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus* (cepa YBT-020) F0PNG8 (E91S), F0PNG8 (E91A), F0PNG8 (E91H), F0PNG8 (E91K), F0PNG8 (E91R), F0PNG8 (E91Q), F0PNG8 (E91T), F0PNG8 (E91N), F0PNG8 (E91Y), F0PNG8 (E91D); *Bacillus cereus* (cepa ATCC 14579/DSM 31) Q81DR3, Q81DR3 (E91S), Q81DR3 (E91A), Q81DR3 (E91H), Q81DR3 (E91K), Q81DR3 (E91R), Q81DR3 (E91Q), Q81DR3 (E91T), Q81DR3 (E91N), Q81DR3 (E91Y), Q81DR3 (E91D); *Bacillus cereus* (cepa ZK/E33L) Q63BK8, Q63BK8 (E91S), Q63BK8 (E91A), Q63BK8 (E91H), Q63BK8 (E91K), Q63BK8 (E91R), Q63BK8 (E91Q), Q63BK8 (E91T), Q63BK8 (E91N), Q63BK8 (E91Y), Q63BK8 (E91D).

#### **Secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa basada en las enzimas *Pseudomonas* EC 3.1.2.4**

Se desvela una secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa basada en las enzimas de *Pseudomonas* EC 3.1.2.4 (SEQ ID NO: 9) y, en varias realizaciones, las malonil-CoA hidrolasas adecuadas para su uso en los procedimientos de la invención tienen al menos un 75 % de identidad con esta secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa. En varias realizaciones, las enzimas adecuadas para la mutación del resto clave de ácido glutámico a X<sub>1</sub> de acuerdo con la invención para conferir actividad malonil-CoA hidrolasa tienen un 80 %, 90 % o 95 % o más de identidad con la SEQ ID NO: 9. Las proteínas que tienen una homología significativa con esta secuencia consenso incluyen: ID UniProt: F5KBQ4 (80 % de identidad), ID UniProt: A6VAN3 (81 % de identidad), ID UniProt: A4XS22 (81 % de identidad), ID UniProt: F6AA82 (75 % de identidad), ID UniProt: E2XN63 (84 % de identidad), ID UniProt: F2KE35 (85 % de identidad), ID UniProt: C3KDS5 (83 % de identidad), ID UniProt: F8G3B7 (86 % de identidad), ID UniProt: G8PYD2 (85 % de identidad), ID UniProt: Q4KGS1 (82 % de identidad), ID UniProt: Q3KGL5 (85 % de identidad), ID UniProt: BOKV51 (86 % de identidad), ID UniProt: B1J4J2 (86 % de identidad), ID UniProt: A5W8H3 (86 % de identidad), ID UniProt: Q88N06 (86 % de identidad), ID UniProt: Q115T5 (84 % de identidad), ID UniProt: F8H1A4 (77 % de identidad), ID UniProt: A4VIV7 (77 % de identidad) e ID UniProt: Q9I5I5 (81 % de identidad). En algunas realizaciones, una malonil-CoA hidrolasa con una identidad igual o superior al 75 % con la secuencia consenso SEQ ID NO: 9 se expresa en una célula huésped recombinante y se usa para producir malonato de acuerdo con la invención. Las secuencias para A4XS22 (SEQ ID NO: 45), F6AA82 (SEQ ID NO:50) y E2XN63 (SEQ ID NO:48), cada una de las cuales contiene X<sub>1</sub> en la posición del resto clave de ácido glutámico que está mutado de acuerdo con la invención, se incluyen en el listado de secuencias.

Los aminoácidos altamente conservados en esta secuencia consenso (SEQ ID NO: 9) son M1, E6, G13, R15, I16, A19, L21, D22, A23, L27, N28, A29, L30, L32, P33, M34, I35, L38, W45, A46, C53, V54, L56, R57, G58, N59, G60, K62, A63, F64, C65, A66, G67, G68, V70, L73, C77, P81, G82, P85, L87, A88, F91, F92, Y96, R97, L98, H103, P106, K107, P108, C111, W112, H114, G115, V117, G119, G120, G121, M122, G123, L124, Q126, R131, I132, V133, T134, P135, R138, L139, M141, P142, E143, I146, G147, L148, D151, V152, G153, S155, F157, L158, R160, P162, G163, L165, G166, L167, F168, L171, N177, D180, A181, D183, L184, L186, A187, D188, R189, Q195, Q196, L199, L203, Q205, N207, W208, E210, Q215, L216, S218, L219, A222, P232, L237, R239, R240, D244, L247, D248, A258, D267, L269, G280, P282, V288, W289, Q291, R294, R296, L298, S299, L300, E307, Y308, S311, L312, N313, C314, R316, H317, P318, F320, E322, G323, V324, R325, A326, R327, L328, D330, D332, P335, W337, W339, P346, A352, H353 y F354. En varias realizaciones, las enzimas malonil-CoA hidrolasas homólogas a esta secuencia consenso (SEQ ID NO: 9) contienen al menos el 25 % de estos aminoácidos conservados, a menudo la mayoría (más del 50 %) de estos aminoácidos conservados, y en ocasiones todos estos aminoácidos conservados.

Algunos aminoácidos en esta secuencia consenso (SEQ ID NO: 9) son esenciales para la actividad y se conservan en todos los miembros de la clase. Las enzimas malonil-CoA hidrolasas comprendidas en la secuencia consenso basada en *Pseudomonas* EC 3.1.2.4 contienen seis restos conservados en el sitio activo necesarios para la actividad hidrolasa (i) tres restos de aminoácidos en el sitio activo (G67, G68, G120) de la secuencia consenso que se considera necesaria (aunque la invención no está limitada por ninguna teoría del mecanismo de acción) para la formación de un orificio de oxianión responsable de la estabilización del anión intermedio enolato derivado de un sustrato de acil-CoA; (ii) dos restos de aminoácidos (E143, D151) de la secuencia consenso que se cree que son necesarios para la hidrólisis de acil-CoA; y (iii) se cree que el aminoácido X<sub>1</sub>95 (de la SEQ ID NO: 9) es necesario

para la unión del sustrato malonil-CoA. Por tanto, de estos seis restos, cinco están presentes en la secuencia consenso (SEQ ID NO: 9) y en todas las malonil-CoA hidrolasas abarcadas por esa secuencia, y el sexto, X<sub>1</sub>95 es necesario para proporcionar una malonil-CoA hidrolasa de la invención capaz de producir malonato en una célula huésped recombinante. En diversas realizaciones de la invención, el resto de ácido glutámico clave (E95) es (ha sido) mutado a un aminoácido polar o cargado positivamente (es decir, R, H, K, S, T, N, Q, Y), o A o D, para producir X<sub>1</sub>95 y proporcionar una malonil-CoA hidrolasa de la invención capaz de producir malonato en una célula huésped recombinante. En algunas realizaciones de la invención, el aminoácido E95 es (ha sido mutado a) un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K, S, T, N, Y, A y D. En algunas realizaciones de la invención, el aminoácido E95 es S o N. Los seis restos esenciales de la secuencia consenso (G67, G68, G120, E143, D151, X<sub>1</sub>95) corresponden a G67, G68, G120, E143, D151 y E95 (típicamente mutados a X<sub>1</sub>), respectivamente, en *Pseudomonas fulva* (12-X) F6AA82-2 utilizada para ilustrar la invención en el ejemplo 31 (véase la SEQ ID NO:50 que contiene las mutaciones E95S/Q348A).

Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas para la hidrólisis de malonil-CoA homólogas a la secuencia consenso (SEQ ID NO: 9) y codificadas por ácidos nucleicos clonados o sintetizados proporcionados por la invención incluyen enzimas mutantes que contienen al menos una mutación ilustrada por el grupo de enzimas mutantes que consisten en *Pseudomonas fulva* (cepa 12-X) F6AA82 (E95S), F6AA82 (E95N), F6AA82 (E95A), F6AA82 (E95H), F6AA82 (E95K), F6AA82 (E95R), F6AA82 (E95Q), F6AA82 (E95D), F6AA82 (E95T), F6AA82 (E95Y) como se demuestra en el ejemplo 43; de *Pseudomonas fluorescens* WH6 E2XN63 (E95S), E2XN63 (E95N), E2XN63 (E95A), E2XN63 (E95H), E2XN63 (E95K), E2XN63 (E95R), E2XN63 (E95Q), E2XN63 (E95D), E2XN63 (E95T), E2XN63 (E95Y); de *Pseudomonas mendocina* (cepa ymp) A4XS22 (E95S), A4XS22 (E95N), A4XS22 (E95A), A4XS22 (E95H), A4XS22 (E95K), A4XS22 (E95R), A4XS22 (E95Q), A4XS22 (E95D), A4XS22 (E95T), E2XN63 (E95Y).

En diversas realizaciones de la invención, la malonil-CoA hidrolasa es F6AA82 (E95S) de *Pseudomonas fulva* (cepa 12-X), E2XN63 (E95S) de *Pseudomonas fluorescens* WH6, A4XS22 (E95S) from *Pseudomonas mendocina* (cepa ymp), como se ilustra en el Ejemplo 31.

Como se ilustra en el Ejemplo 43, las mutaciones F6AA82 E95X<sub>1</sub> dieron como resultado una actividad malonil-CoA hidrolasa. Las proteínas F6AA82 que contienen las mutaciones E95S, E95Y, E95T, E95N, E96K, E95A y E95D produjeron significativamente (prueba t, p <0,05) más malonato que la proteína F6AA82 de tipo salvaje. Las proteínas F6AA82 que contienen estas mutaciones son adecuadas para usar como malonil-CoA hidrolasas y para la producción de malonato. De las enzimas F6AA82 que contienen una mutación X<sub>1</sub> que confiere actividad malonil-CoA hidrolasa, se prefieren las mutaciones E95S o E95N. De las enzimas F6AA82 que contienen una mutación X<sub>1</sub> que confiere actividad malonil-CoA hidrolasa, las mutaciones E95A, E95T, E95K, E95Y y E95D son adecuadas. En diversas realizaciones de la invención, la malonil-CoA hidrolasa es F6AA82 (E95S). En otras realizaciones de la invención, la malonil-CoA hidrolasa es F6AA82 (E95N). Las proteínas F6AA82 que contienen las mutaciones E95H, E95Q o E95R no dieron como resultado un aumento en la producción de malonato en las condiciones de prueba empleadas como se describe en los ejemplos.

Cuando una enzima con homología sustancial a una secuencia consenso en el presente documento tiene una actividad malonil-CoA hidrolasa subóptima o carece de la misma, de acuerdo con la invención, puede mutarse para adecuarse a una secuencia consenso proporcionada en el presente documento para proporcionar una malonil-CoA hidrolasa de la invención. Por ejemplo, la proteína A5W8H3 muestra una identidad del 86 % con el consenso de malonil-CoA hidrolasa de SEQ ID NO: 9, pero no muestra actividad malonil-CoA hidrolasa (ejemplo 31). Uno o más aminoácidos que difieren entre A5W8H3 y el consenso de SEQ ID NO: 9 pueden mutarse para introducir actividad malonil-CoA hidrolasa. Específicamente las mutaciones A5W8H3 T2N, C5F, V7J, L8B, G10U, D12B, P24J, A26U, N31U, Q41B, A72B, A740, Q75J, S83J, S90B, A94J, F100B, A101B, N129U, A159U, F1690, P175B, G185J, G192B, A198J, A213J, N217B, Q224J, C228B, A229J, W2360, H241Q, E242B, Q245J, A2520, R261A, Q264J, D272B, G274A, Q275B, Y297B, Q302J, Q305B, M3100, N333B, A347J, A355J, A3570 y/o G368U pueden usarse para impartir actividad malonil-CoA hidrolasa.

#### **Secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa basada en las enzimas EC 3.1.2.4 bacterianas**

A pesar de que *Bacillus* y *Pseudomonas* son evolutivamente distantes (es decir, *Bacillus* es grampositivo y *Pseudomonas* es gramnegativo), existe una conservación de secuencia significativa entre las enzimas *Bacillus* EC 3.1.2.4 y *Pseudomonas* EC 3.1.2.4. Se desvela una secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa basada en estas EC 3.1.2.4 acil-CoA hidrolasas bacterianas (SEQ ID NO: 10). Las enzimas malonil-CoA hidrolasas englobadas en esta secuencia consenso suelen poseer al menos el 25 % (o la mayoría o todos) de los aminoácidos altamente conservados de esta secuencia, cuyos aminoácidos conservados se seleccionan del grupo que consiste en L53, L59, N60, L62, M66, L88, F97, C98, A99, G100, G101, F124, F125, Y129, K140, P141, G148, G152, G153, G154, G156, L157, T167, M174, P175, E176, I179, G180, D184, V185, G186, L191, L210, D219, A226, P333, N364, F375, E377, D385 y P390. Una malonil-CoA hidrolasa adecuada de la invención homóloga a esta secuencia consenso incluye los aminoácidos del sitio activo necesarios para la hidrólisis de malonil-CoA (G100, G101, G153, E176 y D184) de la secuencia consenso, así como X<sub>1</sub> 128, en la que el resto de ácido glutámico clave de tipo salvaje (E128) es (ha sido) mutado a un aminoácido polar o cargado (es decir, R, H, K, S, T, N, Q, Y), o D o A, y es capaz de producir malonato en una célula huésped recombinante.

**Malonil-CoA hidrolasas basadas en malonil-CoA:ACP hidrolasas**

La malonil-CoA hidrolasa puede ser una malonil-CoA :ACP transacilasa mutada (EC 2.3.1.39). Se desvela una secuencia FabD de *E. coli* (SEQ ID NO: 53) y las malonil-CoA hidrolasas adecuadas para su uso en los procedimientos de la invención pueden tener al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de identidad de secuencia cuando se alinean en relación con la SEQ ID NO: 53 y contiene una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos en las posiciones alineadas: S92C, H201N, R117D, R117E, R117N, R117Y, R117G, R117H, Q11D, Q11E, Q11N, Q11Y, Q11G, Q11H, L93A, L93V, L93I, L93F, L93S, L93G.

La malonil-CoA hidrolasa puede ser una malonil-CoA FabD de malonil CoA:ACP transacilasa mutada de *E. coli* (véase la SEQ ID NO: 53 para la secuencia de tipo salvaje) con una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en S92C, H201N, R117D, R117E, R117N, R117Y, R117G, R117H, Q11D, Q11E, Q11N, Q11Y, Q11G, Q11H, L93A, L93V, L93I, L93F, L93S, L93G. El ejemplo 35 ilustra células de levadura recombinantes que expresan una enzima FabD de *E. coli* mutada que contiene una de las siguientes combinaciones de las mutaciones S92C/I91V/R117H, L91I-R117Y, A246E, Q80L/I91S/R117G y L91I/R117Y, y que producen malonato a niveles más altos que la levadura de tipo salvaje sin una enzima FabD mutada.

**Sección 3: Vectores de expresión**

En la presente invención, la célula huésped recombinante se ha modificado mediante "ingeniería genética" para producir una enzima malonil-CoA hidrolasa recombinante y malonato. La célula huésped se diseña típicamente mediante tecnología de ADN recombinante para expresar ácidos nucleicos heterólogos que codifican una malonil-CoA hidrolasa, que es una versión mutada de una acil-CoA hidrolasa o transacilasa natural o una malonil-CoA hidrolasa no natural preparada de acuerdo con una de las secuencias consenso proporcionadas en el presente documento o es una acil-CoA hidrolasa natural con actividad malonil-CoA hidrolasa que se sobreexpresa en la célula en la que se produce de forma natural o se expresa de manera heteróloga en una célula en la que no se produce de forma natural.

Las construcciones de ácidos nucleicos a las que se hace referencia en el presente documento incluyen vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican una o más enzimas malonil-CoA hidrolasas. Los ácidos nucleicos que codifican las enzimas se unen operativamente a promotores y, opcionalmente, a otras secuencias de control, de modo que las enzimas en cuestión se expresan en una célula huésped que contiene el vector de expresión cuando se cultivan en condiciones adecuadas. Los promotores y las secuencias de control empleadas dependen de la célula huésped seleccionada para la producción de malonato. Por lo tanto, la invención proporciona no solo vectores de expresión sino también construcciones de ácidos nucleicos útiles en la construcción de vectores de expresión. Los procedimientos para diseñar y hacer construcciones de ácidos nucleicos y vectores de expresión generalmente son bien conocidos por los expertos en la técnica y, por lo tanto, solo se revisan brevemente en el presente documento.

Los ácidos nucleicos que codifican las enzimas malonil-CoA hidrolasas pueden prepararse por cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, síntesis química directa y clonación. Además, Las secuencias de ácido nucleico para su uso en la invención pueden obtenerse de proveedores comerciales que proporcionan síntesis *de novo* de los ácidos nucleicos.

Un ácido nucleico que codifica la enzima deseada puede incorporarse en un vector de expresión por procedimientos conocidos que incluyen, por ejemplo, el uso de enzimas de restricción para escindir sitios específicos en un vector de expresión, por ejemplo, plásmido, produciendo así un vector de expresión de la invención. Algunas enzimas de restricción producen extremos monocatenarios que pueden hibridar con una secuencia de ácido nucleico que tiene, o se sintetiza para que tenga, un extremo con una secuencia complementaria a los extremos del vector de expresión escindido. Después, los extremos se unen covalentemente utilizando una enzima apropiada, por ejemplo, ADN ligasa. se pueden usar enlazadores de ADN para facilitar la unión de secuencias de ácidos nucleicos en un vector de expresión.

Un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos individuales también se puede combinar utilizando procedimientos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, cada una de las secuencias de ácido nucleico deseadas puede generarse inicialmente en una PCR separada. Posteriormente, se diseñan cebadores específicos de forma tal que los extremos de los productos de PCR contienen secuencias complementarias. Cuando se mezclan los productos de PCR, se desnaturalizan y se rehibridan, las cadenas que tienen las secuencias coincidentes en sus extremos 3' se superponen y pueden actuar como cebadores entre sí. La extensión de esta superposición por la ADN polimerasa produce una molécula en la que las secuencias originales se "cortan y empalman". De esta forma, una serie de secuencias de ácido nucleico individuales se pueden unir y posteriormente transducir en una célula huésped de forma simultánea. Por lo tanto, se efectúa la expresión de cada una de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico.

Un vector de expresión típico contiene la secuencia de ácido nucleico deseada precedida y, opcionalmente, seguida por una o más secuencias de control o regiones reguladoras, incluyendo un promotor y, cuando el producto genético es una proteína, el sitio de unión al ribosoma, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que generalmente tiene

una longitud de 3-9 nucleótidos y, generalmente, se ubica entre 3 y 11 nucleótidos cadena arriba del codón de iniciación que precede a la secuencia de codificación, seguida de un terminador de la transcripción en el caso de *E. coli* u otros huéspedes procariontes (véase Shine y col., *Nature* 254: 34 (1975) y Steitz, en *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (ed. R. F. Goldberger), vol. 1, pag. 349 (1979) Plenum Publishing, N.Y.). En el caso de huéspedes eucariotas como la levadura, un vector de expresión típico contiene la secuencia de codificación de ácido nucleico deseada precedida por una o más regiones reguladoras, junto con una secuencia Kozak para iniciar la traducción y seguido de un terminador (véase Kozak, *Nature* 308:241-246 (1984)).

Las regiones reguladoras o secuencias control incluyen, por ejemplo, las regiones que contienen un promotor y un operador. Un promotor está unido operativamente a la secuencia de codificación de ácido nucleico deseada, iniciando así la transcripción de la secuencia de ácido nucleico a través de una ARN polimerasa. Un operador es una secuencia de ácidos nucleicos adyacente al promotor, que contiene un dominio de unión a proteína en el que se puede unir un factor de transcripción. Los factores de transcripción activan o reprimen el inicio de la transcripción de un promotor. De esta forma, se logra el control de la transcripción, basado en las regiones reguladoras particulares utilizadas y la presencia o ausencia del factor de transcripción correspondiente. Los ejemplos no limitantes para la expresión procarionte incluyen promotores de lactosa (la proteína represora LacI cambia la conformación cuando entra en contacto con lactosa, evitando así que la proteína represora LacI se una al operador) y los promotores de triptófano (cuando forman complejo con triptófano, la proteína represora TrpR tiene una conformación que se une al operador; en ausencia de triptófano, la proteína represora TrpR tiene una conformación que no se une al operador). Los ejemplos de promotores para usar para la expresión eucariota incluyen pTDH3, pTEF1 (como se ilustra en el Ejemplo 31), pTEF2, pRNR2, pRPL18B, pREV1, pGAL1, pGAL10, pGAPDH, pCUP1, pMET3, pPGK1, pPYK1, pHXT7, pPDC1, pFBA1, pTDH2, pPGI1, pPDC1, pTPI1, pENO2, pADH1 y pADH2. Como se describe en el Ejemplo 44, se ha demostrado que los promotores de los genes HSP150, PGK1, PHO5, SCT1, PRB1, TPI1, ACH1, HXK2, ACO1, JEN1, MDH2, POX1, CIT1, ALD4, ADH1, TDH3, ADH2 y SDH1 de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* son útiles para la producción de ácido malónico de acuerdo con la invención. Como apreciarán los expertos en la técnica, en la presente invención se pueden usar diversos vectores de expresión y componentes de los mismos.

Aunque se puede usar cualquier vector de expresión adecuado para incorporar las secuencias deseadas, los vectores de expresión fácilmente disponibles incluyen: plásmidos, tales como pESC, pTEF, p414CYC1, p414GALS, pSC101, pBR322, pBBR1MCS, 3, pUR, pEX, pMR100, pCR4, pBAD24, pUC19, pRS; y bacteriófagos, tales como el fago M13 y el fago  $\lambda$ . Por supuesto, dichos vectores de expresión solo pueden ser adecuados para células huésped particulares o para la expresión de malonil-CoA hidrolasas particulares. Un experto en la técnica, sin embargo, puede determinar fácilmente a través de la experimentación rutinaria si un vector de expresión particular es adecuado para cualquier proteína o célula huésped dada. Por ejemplo, el vector de expresión se puede introducir en la célula huésped, que después se vigila para determinar la viabilidad y la expresión de las secuencias contenidas en el vector. Además, se puede hacer referencia a los textos y literatura relevantes, que describen los vectores de expresión y su idoneidad para cualquier célula huésped en particular. Además del uso de vectores de expresión, se generan cepas en las que los casetes de expresión se integran directamente en el genoma del huésped.

Los vectores de expresión se introducen o transfieren, por ejemplo, mediante transducción, transfección o transformación, en la célula huésped. Tales procedimientos para introducir vectores de expresión en células huésped son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento para transformar *E. coli* con un vector de expresión implica un tratamiento con cloruro de calcio en el que el vector de expresión se introduce a través de un precipitado de calcio.

Para identificar si un ácido nucleico se ha introducido con éxito o en una célula huésped, existen diversos procedimientos. Por ejemplo, se puede separar un cultivo de células huésped potencialmente transformadas utilizando una dilución adecuada, en células individuales y, posteriormente, se cultivan individualmente y se analizan para determinar la expresión de un producto génico deseado de un gen contenido en el ácido nucleico introducido. Por ejemplo, una práctica de uso frecuente implica la selección de células basadas en la resistencia a los antibióticos que ha sido conferida por los genes que confieren resistencia a los antibióticos en el vector de expresión, tales como los genes de betalactamasa (*amp*), aminoglucósido fosfotransferasa (*neo*) e higromicina fosfotransferasa (*hig*, *hph*, *hpt*).

Habitualmente, una célula huésped de la invención se habrá transformado con al menos un vector de expresión. Cuando solo se usa un solo vector de expresión, el vector contendrá típicamente un gen de malonil-CoA hidrolasa. Una vez que la célula huésped ha sido transformada con el vector de expresión, la célula huésped se cultiva en un medio adecuado que contiene una fuente de carbono, tal como un azúcar (por ejemplo, glucosa). A medida que la célula huésped se cultiva, se produce expresión de la enzima o enzimas para producir malonato. Una vez expresadas, la enzima o enzimas catalizan la hidrólisis del enlace tioéster de malonil-CoA, liberando de esta manera malonato y CoA.

Si una célula huésped de la invención incluye más de un gen heterólogo, los múltiples genes pueden expresarse a partir de uno o más vectores. Por ejemplo, un solo vector de expresión puede comprender uno, dos o más genes que codifican una, dos o más enzimas malonil-CoA hidrolasa y/u otras proteínas que proporcionan alguna función útil, por ejemplo, mejores rendimiento, título y/o productividad de malonato. Los genes heterólogos pueden estar contenidos en un vector replicado episomalmente o en un vector integrado en el genoma de la célula huésped, y

cando se usa más de un vector, todos los vectores pueden replicarse episomalmente (extracromosómicamente), o todos los vectores pueden integrarse, o algunos pueden integrarse y algunos pueden replicarse episomalmente. La integración cromosómica se utiliza normalmente para las células que sufrirán una propagación sostenida, por ejemplo, las células utilizadas para la producción de malonato para aplicaciones industriales. El ejemplo 45 ilustra los beneficios de la integración genómica de un gen de malonil-CoA hidrolasa proporcionado por la invención; en ese ejemplo, se muestra que una única copia integrada del gen da como resultado títulos de ácido malónico más altos que los obtenidos cuando se expresa el mismo gen a partir de un plásmido. Este ejemplo también sirve para demostrar la modulación de la producción de ácido malónico como se proporciona en la invención, como un aumento en el número de copias del gen que codifica la malonil-CoA hidrolasa por célula, da como resultado un aumento de ácido malónico en los medios de fermentación. Mientras que un "gen" está generalmente compuesto por un único promotor y una sola secuencia de codificación, en ciertas células huésped, dos o más secuencias de codificación pueden estar controladas por un promotor en un operón. En algunas realizaciones, se utiliza un sistema de dos o tres operones.

Las secuencias de codificación empleadas pueden haber sido modificadas, con respecto a alguna secuencia de referencia, para reflejar la preferencia de codón de una célula huésped seleccionada. Las tablas de uso de codones para numerosos organismos están fácilmente disponibles y se pueden usar para guiar el diseño de secuencias. El uso de codones prevalentes de un organismo huésped dado generalmente mejora la traducción de la secuencia diana en la célula huésped. Como ejemplo, las secuencias de ácido nucleico sujeto pueden modificarse para la preferencia del codón de levadura (véase, por ejemplo, Bennetzen y col., J. Biol. Chem. 257: 3026-3031 (1982)), o pueden modificarse para la preferencia de codón de *E. coli* (véase, por ejemplo, Nakamura y col., Nucleic Acids Res. 28:292 (2000)) o puede modificarse para incluir codones optimizados para la preferencia de codones de *S. cerevisiae* (véase el Ejemplo 42).

Los ácidos nucleicos pueden prepararse mediante diversas técnicas recombinantes de rutina. En resumen, los ácidos nucleicos sujeto pueden prepararse a partir de fragmentos de ADN genómico, ADNc y ARN, todos los cuales pueden extraerse directamente de una célula o producirse de forma recombinante mediante varios procedimientos de amplificación, incluyendo PCR y rt-PCR. Los ácidos nucleicos sujeto también pueden prepararse mediante síntesis química directa.

Los niveles de transcripción de ácido nucleico en un microorganismo huésped pueden aumentarse (o disminuirse) utilizando numerosas técnicas. Por ejemplo, el número de copias del ácido nucleico puede aumentarse mediante el uso de vectores de expresión de mayor número de copias que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos, o mediante la integración de múltiples copias del ácido nucleico deseado en el genoma del microorganismo huésped, como se demuestra en el Ejemplo 45. Los ejemplos de integración de una secuencia de ácido nucleico deseada en el cromosoma huésped incluyen la recombinación mediada por *recA*, recombinación mediada por recombinasa del fago lambda e inserción de transposones. Los niveles de transcripción de ácido nucleico pueden aumentarse cambiando el orden de las regiones codificantes en un ARNm policistrónico o dividiendo un operón policistrónico en múltiples operones policistrónicos o monocistrónicos, cada uno con su propio promotor. Los niveles de ARN pueden aumentarse (o disminuirse) aumentando (o disminuyendo) la fuerza del promotor al que la región codificadora de proteínas está unida operativamente. Las técnicas ilustrativas para el diseño y ensamblaje de plásmidos para proporcionar la producción de malonato se proporcionan en los Ejemplos 1, 3, 31 y 35.

El nivel de traducción de una secuencia polipeptídica deseada en un microorganismo huésped también puede aumentarse de varias maneras. Los ejemplos incluyen aumentar la estabilidad del ARNm, modificar la secuencia del sitio de unión al ribosoma (o Kozak), modificar la distancia o la secuencia entre el sitio de unión al ribosoma (o secuencia Kozak) y el codón de iniciación de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido deseado, modificar la región intercistrónica ubicada en 5' respecto al codón de iniciación de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido deseado, estabilizar el extremo 3' del transcrito del ARNm, modificar el uso de codones del polipéptido, alterar la expresión de ARNt de codones de bajo uso/raros utilizados en la biosíntesis del polipéptido. La determinación de codones preferentes y ARNt de codones raros o de bajo uso se puede basar en un análisis de secuencia de genes derivados del microorganismo huésped.

La semivida del polipéptido, o estabilidad, puede aumentarse a través de la mutación de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido deseado, lo que da como resultado la modificación de la secuencia polipeptídica deseada en relación con la secuencia polipeptídica control. Cuando el polipéptido modificado es una enzima, la actividad de la enzima en un huésped puede alterarse debido al aumento de la solubilidad en la célula huésped, función mejorada al pH deseado, eliminación de un dominio que inhibe la actividad enzimática, parámetros cinéticos mejorados (valores de  $K_m$  más bajos o de  $K_{cat}$  más altos) para el sustrato deseado, y eliminación de la regulación alostérica por un metabolito intracelular. Las enzimas alteradas/modificadas también pueden aislarse mediante mutagénesis aleatoria de una enzima, de tal manera que la enzima alterada/modificada puede expresarse a partir de un vector episomal o de un gen recombinante integrado en el genoma de un microorganismo huésped.

#### Sección 4: Células huésped recombinantes

En un aspecto, la invención proporciona células huésped recombinantes adecuadas para la producción biológica de malonato. Cualquier célula huésped adecuada puede usarse en la práctica de los procedimientos de la presente

invención. En algunas realizaciones, la célula huésped es un microorganismo huésped recombinante en el que se han insertado, delecionado o modificado moléculas de ácido nucleico (es decir, mutado; por ejemplo, mediante inserción, deleción, sustitución, y/o inversión de nucleótidos), ya sea para producir malonato o para aumentar el rendimiento, el título y/o la productividad del malonato en relación con una "célula control" o "célula de referencia". Una "célula control" se puede usar con fines comparativos y es típicamente una célula parental recombinante o de tipo salvaje que no contiene una o más de las modificaciones realizadas en la célula huésped de interés.

En una realización importante, la presente invención proporciona células de levadura recombinantes adecuadas para la producción de malonato a niveles suficientes para su posterior purificación y uso como se describe en el presente documento. Las células huésped de levadura son células huésped excelentes para la construcción de rutas metabólicas recombinantes que comprenden enzimas heterólogas que catalizan la producción de productos de moléculas pequeñas. Existen técnicas establecidas de biología molecular y ácidos nucleicos que codifican elementos genéticos necesarios para la construcción de vectores de expresión de levadura, incluyendo promotores, orígenes de replicación, marcadores de resistencia a antibióticos, marcadores auxótrofos, terminadores y similares. En segundo lugar, las técnicas para la integración de los ácidos nucleicos en el cromosoma de levadura están bien establecidas. La levadura también ofrece una serie de ventajas como huésped de fermentación industrial. La levadura puede tolerar altas concentraciones de ácidos orgánicos y mantener la viabilidad celular a un pH bajo y puede crecer tanto en condiciones de cultivo tanto aerobias como anaerobias, y existen caldos de fermentación y protocolos de fermentación establecidos. La capacidad de una cepa para propagarse y/o producir el producto deseado a pH bajo proporciona varias ventajas con respecto a la presente invención. En primer lugar, esta característica proporciona tolerancia al ambiente creado por la producción de ácido malónico. En segundo lugar, desde el punto de vista del procedimiento, la capacidad de mantener un entorno de pH bajo limita el número de organismos que pueden contaminar y estropear un lote. En tercer lugar, esta característica también elimina o al menos reduce la necesidad de agregar ácido adicional para facilitar la purificación del ácido malónico mediante algunos procedimientos proporcionados por la invención (véase el Ejemplo 37).

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped recombinante que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una malonil-CoA hidrolasa es un eucariota. En varias realizaciones, el eucariota es una levadura seleccionada de la siguiente lista de géneros; *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Issatchenkii*, *Kluyveromyces*, *Komagataella*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* o *Yarrowia*. En varias realizaciones, la levadura es de una especie seleccionada del grupo que consiste en *Candida albicans*, *Candida etanolica*, *Candida Krusei*, *Cándida metanosorbosa*, *Candida sonorensis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus curvatus*, *Hansenula polymorpha*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Komagataella pastoris*, *Lipomyces starkeyi*, *Pichia angusta*, *Pichia deserticola*, *Pichia galeiformis*, *Pichia kodamae*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia pastoris*, *Pichia salictaria*, *Pichia stipitis*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia trehalophila*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces boulardi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri* y *Yarrowia lipolytica*. Un experto en la técnica reconocerá que esta lista abarca levaduras en el sentido más amplio, incluyendo tanto cepas oleaginosas como no oleaginosas. Los ejemplos 46 y 47 ilustran el uso de la cepa Y-134 de *Pichia kudriavzevii* de acuerdo con la invención.

La invención proporciona células huésped recombinantes alternativas para la producción biológica de malonato. Ejemplos ilustrativos incluyen células eucariotas, procariotas y arqueas. Ejemplos ilustrativos de células eucariotas incluyen: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Cryptocodium cohnii*, *Cunninghamella japónica*, *Entomophthora coronata*, *Mortierella alpina*, *Mucor circinelloides*, *Neurospora crassa*, *Pythium ultimum*, *Schizochytrium limacinum*, *Thraustochytrium aureum*, *Trichoderma reesei* y *Xanthophyllomyces dendrorhous*. En general, si se utiliza una célula eucariota, se emplea una cepa no patógena. Ejemplos ilustrativos de cepas no patógenas incluyen, aunque sin limitaciones: *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*. Además, ciertas cepas, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, han sido designados por la Administración de Alimentos y Medicamentos como considerados generalmente como seguros (o GRAS) y, por lo tanto, pueden emplearse convenientemente en diversas realizaciones de los procedimientos de la invención.

Los ejemplos ilustrativos de células huésped procariotas recombinantes proporcionados por la invención incluyen *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Clostridium beigeringkii*, *Enterobacter sakazakii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Mesorhizobium loti*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces aureus*, *Streptomyces fungicidicus*, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivogriseus*, *Streptomyces rameus*, *Streptomyces tanashiensis* y *Streptomyces vinaceus*. Algunas de estas células, incluyendo *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, han sido designadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos como considerados generalmente como seguros (o GRAS) y, por lo tanto, se emplean en diversas realizaciones de los procedimientos de la invención. Si bien es deseable desde el punto de vista de la seguridad pública y regulatoria, el estado de GRAS no afecta a la capacidad de una cepa huésped para su uso en la práctica de la presente invención; por tanto, los organismos no GRAS e incluso patógenos se incluyen en la lista de cepas huésped ilustrativas adecuadas para su uso en la práctica de la presente invención.

*Escherichia coli* también es una excelente célula huésped procariota para la construcción de rutas metabólicas, y *E.*

*coli* también se utiliza en la fermentación industrial de productos de moléculas pequeñas. A diferencia de la mayoría de las cepas de levadura de tipo salvaje, *E. coli* de tipo salvaje puede catabolizar azúcares tanto pentosas como hexosas como fuentes de carbono. *E. coli* también tiene un tiempo de duplicación más corto en comparación con la levadura, lo que permite realizar experimentos más rápidamente. La presente invención proporciona una amplia gama de células huésped de *E. coli* adecuadas para la producción de malonato como se describe en el presente documento. En diversas realizaciones de los procedimientos de la invención, la célula huésped recombinante que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una malonil-CoA hidrolasa es una célula de *E. coli*.

#### **Sección 5: Modificaciones adicionales y condiciones de fermentación para mejorar la producción de malonato**

En otros aspectos de la invención, se consigue un mayor rendimiento, título, y/o productividad de malonato mediante el empleo de células huésped proporcionadas por la invención que se han modificado genéticamente en formas distintas, o además de, la introducción de una malonil-CoA hidrolasa heteróloga y/o empleando las condiciones de fermentación proporcionadas por ciertos procedimientos de la invención. En resumen, la célula huésped recombinante de la invención comprende modificaciones genéticas que aumentan la biosíntesis de acetil-CoA, aumentan la biosíntesis de malonil-CoA, disminuyen el catabolismo del malonato, aumentan la secreción de malonato desde la célula huésped, aumentan la tolerancia de la célula huésped al malonato y aumentan el catabolismo de varias fuentes de carbono.

#### **Modificaciones genéticas y condiciones de fermentación que aumentan la biosíntesis de acetil-CoA**

De acuerdo con la invención, se puede lograr un título, rendimiento y/o productividad mayores de malonato mediante modificaciones genéticas que aumentan la biosíntesis de acetil-CoA y la invención proporciona enzimas que aumentan la biosíntesis de acetil-CoA, vectores para expresar enzimas que aumentan la biosíntesis de acetil-CoA, células huésped que expresan enzimas que aumentan la biosíntesis de acetil-CoA y aumentan el título, rendimiento y/o productividad de malonato, y procedimientos relacionados con el mismo. Como se ha descrito anteriormente, el malonato se produce mediante hidrólisis de malonil-CoA, que, se puede producir a partir de acetil-CoA; por lo tanto, los aumentos en la biosíntesis de acetil-CoA pueden mejorar la producción de malonato.

Una vía por la cual se produce acetil-CoA es por una acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.1), que cataliza la formación de acetil-CoA a partir de acetato y coenzima A (CoA). La invención proporciona células huésped recombinantes adecuadas para producir malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención que comprenden una o más enzimas heterólogas acetil-CoA sintetasa (ACS) que aumentan el título, rendimiento y/o productividad del malonato en relación con una célula huésped que no comprende una acetil-CoA sintetasa heteróloga. Ejemplos no limitativos de enzimas ACS adecuadas son ACS1 (GenBank: AAC04979.1) y ACS2 (GenBank: CAA97725.1) de *S. cerevisiae*. En algunas realizaciones, una célula huésped recombinante que comprende acetil-CoA sintetasa de *S. cerevisiae* ACS1 y/o ACS2 se usa para aumentar el título, el rendimiento y/o la productividad del malonato. En otras realizaciones, una célula huésped recombinante que comprende una acetil-CoA sintetasa seleccionada del grupo que consiste en Acs de *Salmonella enterica*, AcsA de *Escherichia coli* y AcsA de *Bacillus subtilis* se usa para aumentar el rendimiento, el título y/o la productividad de malonato. Los expertos en la materia aprecian que otras acetil-CoA sintetasas pueden expresarse en una célula huésped recombinante que produce malonato de acuerdo con la invención para aumentar el rendimiento, el título y/o la productividad de malonato. Esta modificación se ilustra en los ejemplos 9 y 46.

Una segunda ruta a través de la cual se produce acetil-CoA es por un complejo de piruvato deshidrogenasa, que cataliza la formación de acetil-CoA a partir de piruvato. La invención proporciona células huésped recombinantes adecuadas para producir malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención que comprenden una o más enzimas heterólogas del complejo de piruvato deshidrogenasa que aumentan el título, el rendimiento y/o la productividad del malonato con respecto a una célula huésped que no comprende una enzima heteróloga del complejo de piruvato deshidrogenasa. Ejemplos no limitativos de enzimas del complejo de piruvato deshidrogenasa adecuadas incluyen PDA1, PDB1, LAT1, LPD1 y PDX1 de *S. cerevisiae*. En algunas realizaciones de la invención, el rendimiento, el título y/o la productividad del malonato aumentan en una célula huésped recombinante utilizada para producir malonato expresando una o más enzimas piruvato deshidrogenasa seleccionadas del grupo que consiste en PDA1, PDB1, LAT1, LPD1 y PDX1 de *S. cerevisiae*. Los expertos en la materia aprecian que otras enzimas piruvato deshidrogenasa pueden expresarse en una célula huésped recombinante que produce malonato de acuerdo con la invención para aumentar el rendimiento, el título y/o la productividad de malonato. Esta modificación se ilustra en el Ejemplo 10.

Una tercera vía a través de la cual se produce acetil-CoA es por una ruta catabólica de etanol heteróloga que comprende enzimas que catalizan la conversión de etanol en acetil-CoA. En comparación con el malonato, el etanol es una sustancia química menos costosa, y las células huésped que producen malonato y que expresan una vía catabólica de etanol pueden convertir el etanol en malonato. Una alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) cataliza la conversión de etanol en acetaldehído. Los ejemplos de enzimas alcohol deshidrogenasas adecuadas incluyen las seleccionadas del grupo que consiste en ADH2 de *S. cerevisiae*, AdhP de *E. coli*, ADH1A de *H. sapiens*, ADH1B de *H. sapiens* y ADH1C de *H. sapiens*. Además de la alcohol deshidrogenasa, una ruta catabólica de etanol también comprende una acetaldehído deshidrogenasa (acilación; EC 1.2.1.10) o una aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.3) y

una acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.1). Una acetaldehído deshidrogenasa (acilante) cataliza la conversión de acetaldehído en acetil-CoA, una aldehído deshidrogenasa cataliza la conversión de acetaldehído en acetato y una acetil-CoA sintasa, como se ha descrito anteriormente, cataliza la formación de acetil-CoA a partir de acetato y CoA. Los ejemplos de acetaldehído deshidrogenasas adecuadas (acilante) incluyen las seleccionadas del grupo que consiste en MhpF de *E. coli*, AdhE de *E. coli*, CF600 DmpF de *Pseudomonas* sp y TodI de *Pseudomonas putida*. Ejemplos no limitantes de aldehído deshidrogenasas incluyen ALD2, ALD3, ALD4, ALD5 y ALD6 de *S. cerevisiae*; y ALD1, ALD2, ALD4 y ALD10 de *H. sapiens*. Los ejemplos de enzimas acetil-CoA sintetasa incluyen ACS1 de *S. cerevisiae*, ACS2 de *S. cerevisiae* y Acs de *E. coli*.

La presente invención proporciona células huésped recombinantes adecuadas para producir malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención que comprenden una o más enzimas catabólicas de etanol heterólogas que aumentan el rendimiento, el título, y/o la productividad de malonato con respecto a las células huésped que no comprenden la enzima o enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol. En algunas realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol son una etanol deshidrogenasa y una acetaldehído deshidrogenasa (acilante). En algunas realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol son una etanol deshidrogenasa ADH2 de *S. cerevisiae* y una acetaldehído deshidrogenasa MhpF de *E. coli* (acilante). En algunas realizaciones, una ADH2 heteróloga de *S. cerevisiae* y MhpF de *E. coli* se expresan en *E. coli* recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga de *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, una ADH2 heteróloga de *S. cerevisiae* y MhpF de *E. coli* se expresan en *S. cerevisiae* recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga de *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, una ADH2 heteróloga de *S. cerevisiae* y MhpF de *E. coli* se expresan en una levadura oleaginoso recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga de *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica de etanol son etanol deshidrogenasa ADH2 de *S. cerevisiae* y acetaldehído deshidrogenasa CF600 DmpF de *Pseudomonas* sp. (acilante). En algunas realizaciones, una ADH2 heteróloga de *S. cerevisiae* y CF600 DmpF de *Pseudomonas* sp. se expresan en *E. coli* recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga de *S. cerevisiae*. En algunas realizaciones, una ADH2 heteróloga de *S. cerevisiae* y CF600 DmpF de *Pseudomonas* sp. se expresan en *S. cerevisiae* recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga de *S. cerevisiae*. En algunas realizaciones, una ADH2 heteróloga de *S. cerevisiae* y CF600 DmpF de *Pseudomonas* sp. se expresan en una levadura oleaginoso recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga de *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica de etanol son etanol deshidrogenasa ADH2 de *S. cerevisiae* y acetaldehído deshidrogenasa TodI de *Pseudomonas putida* (acilante). En algunas realizaciones, una ADH2 heteróloga de *S. cerevisiae* y TodI de *Pseudomonas putida* se expresan en *E. coli* recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga de *S. cerevisiae*. En algunas realizaciones, una ADH2 heteróloga de *S. cerevisiae* y TodI de *Pseudomonas putida* se expresan en *S. cerevisiae* recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga de *S. cerevisiae*. En algunas realizaciones, una ADH2 heteróloga de *S. cerevisiae* y TodI de *Pseudomonas putida* se expresan en una levadura oleaginoso recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga de *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol son una o más alcohol deshidrogenasas seleccionadas del grupo que contiene ADH2 de *S. cerevisiae*, AdhP de *E. coli*, ADH1A de *H. sapiens*, ADH1B de *H. sapiens* y/o ADH1C de *H. sapiens* y una o más acetaldehído deshidrogenasas (aclación) seleccionadas del grupo que contiene MhpF de *E. coli*, AdhE de *E. coli*, CF600 DmpF de *Pseudomonas* sp y TodI de *Pseudomonas putida*. Los expertos en la materia aprecian que otras enzimas alcohol deshidrogenasa y enzimas acetaldehído deshidrogenasa (acilante) pueden expresarse en una célula huésped recombinante adecuada para producir malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención para aumentar el rendimiento, el título y/o la productividad del malonato.

En otras realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol son una etanol deshidrogenasa, una aldehído deshidrogenasa y una acetil-CoA sintetasa. En algunas realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol son una alcohol deshidrogenasa ADL2 de *S. cerevisiae*, una aldehído deshidrogenasa ALD2 de *S. cerevisiae* y una acetil-CoA sintetasa ACS1 de *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol son una alcohol deshidrogenasa ADL2 de *S. cerevisiae*, una aldehído deshidrogenasa ALD2 de *S. cerevisiae* y una acetil-CoA sintetasa ACS2 de *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol son una alcohol deshidrogenasa ADL2 de *S. cerevisiae*, una aldehído deshidrogenasa ALD6 de *S. cerevisiae* y una acetil-CoA sintetasa ACS1 de *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol son una alcohol deshidrogenasa ADL2 de *S. cerevisiae*, una aldehído deshidrogenasa ALD6 de *S. cerevisiae* y una acetil-CoA sintetasa ACS2 de *S. cerevisiae*. En otras realizaciones, las enzimas heterólogas de la vía catabólica del etanol son una o más alcohol deshidrogenasas seleccionadas del grupo que contiene ADH2 de *S. cerevisiae*, AdhP de *E. coli*, ADH1A de *H. sapiens*, ADH1B de *H. sapiens* y ADH1C de *H. sapiens*, una o más aldehído deshidrogenasas seleccionadas del grupo que contiene ALD2 de *S. cerevisiae*, ALD3 de *S. cerevisiae*, ALD4 de *S. cerevisiae*, ALD5 de *S. cerevisiae*, ALD6 de *S. cerevisiae*, ALD1 de *H. sapiens*, ALD2 de *H. sapiens*, ALD4 de *H. sapiens* y/o ALD10 de *H. sapiens* y una o más acetil-CoA sintetasa seleccionadas del grupo que contiene ACS1 de *S. cerevisiae*, ACS2 de *S. cerevisiae* y/o Acs de *E. coli*.

En algunas realizaciones, las células huésped recombinantes adecuadas para producir malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención comprenden una enzima heteróloga de la vía catabólica de etanol y convierten el etanol producido de forma endógena en acetil-CoA y aumentan el rendimiento, el título y/o la productividad de malonato. En otras realizaciones, el etanol se añade exógenamente al caldo de fermentación y las células huésped

recombinantes para producir malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención comprenden una enzima heteróloga de la vía catabólica de etanol y convierten el etanol añadido de forma exógena en acetil-CoA y aumentan el rendimiento, el título y/o la productividad de malonato. Cuando se añade de forma exógena al caldo de fermentación, se añade etanol para obtener una concentración mínima de 1 % etanol en volumen/volumen, y típicamente se añade al caldo de fermentación para obtener una concentración entre 1-15 % en volumen/volumen. El catabolismo del etanol para mejorar la producción de malonato de acuerdo con la invención se ilustra en el Ejemplo 11.

El aumento de las reservas citosólicas de acetil-CoA es una cuarta vía para aumentar la biosíntesis de malonato; en numerosas células vegetales y animales, pero no en *S. cerevisiae*, la ATP citrato liasa (EC 2.3.3.8) es la principal enzima responsable de la biosíntesis citosólica de acetil-CoA. Con más detalle, la acetil-CoA en la mitocondria se condensa con oxaloacetato para formar citrato a través de la actividad de la citrato sintasa. Posteriormente, el citrato se transporta desde la mitocondria al citosol, donde la ATP citrato liasa cataliza la formación de acetil-CoA, oxaloacetato y ADP. Mientras que *S. cerevisiae* no contiene una ATP citrato liasa nativa, se han descrito enzimas heterólogas adecuadas de citrato liasa de ATP en cepas de levadura oleaginosas (véase, por ejemplo, Boulton y col., J. Gen. Microbiol. 127:169-176 (1981)). La presente invención proporciona células huésped recombinantes que comprenden una o más enzimas de ATP citrato liasa de levadura oleaginosas nucleico heterólogas. Los ejemplos no limitantes de enzimas ATP citrato liasa de levadura oleaginosas incluyen las seleccionadas del grupo de levaduras oleaginosas que consisten en *Candida curvata*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces Lipofer*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutanis*, *Trichosporon cutaneum*, *Yarrowia lipolytica* y similares. En varias realizaciones, la célula huésped recombinante comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una ATP citrato liasa. En varias realizaciones, la ATP citrato liasa es de un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Candida curvata*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces Lipofer*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutanis*, *Trichosporon cutaneum*, *Yarrowia lipolytica*. Esta modificación se ilustra en el Ejemplo 12.

La biosíntesis de acetil-CoA también puede aumentarse de acuerdo con la invención alterando la expresión de uno o más ácidos nucleicos que codifican proteínas que afectan al almacenamiento o catabolismo de los ácidos grasos. La presente invención proporciona células huésped que comprenden modificaciones genéticas de uno o más ácidos nucleicos que codifican proteínas que afectan el almacenamiento y catabolismo de los ácidos grasos. En *Saccharomyces cerevisiae*, estas proteínas incluyen SNF2, IRA2, PRE9, PHO90, SPT21, POX1, ANT1, FOX3, PAS1, PAS3, ARE1, ARE2, DGA1, LRO1, ACL1, MAE1, GLC3, GLG1, GLG2, PAT1 y PEX11. Esta modificación se ilustra en el Ejemplo 13.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped comprende modificaciones genéticas que afectan a la expresión y/o la actividad de las proteínas involucradas en el catabolismo de los ácidos grasos. Por ejemplo, la mayoría de las células huésped degradarán de forma natural los ácidos grasos, los ácidos hidroxigrasos y muchos diácidos a través de las vías de beta-oxidación. La beta-oxidación se produce, en la mayoría de los casos, mediante la activación de grupos de ácidos grasos libres en tioésteres de CoA con acil-CoA ligasas. El intermedio de acil-CoA se oxida y se degrada aún más, procediendo a través de un 2,3 enoil-CoA, 3-hidroxiacil-CoA y 3-cetoacil-CoA, y su posterior escisión da como resultado la producción de acetil-CoA y una acil-CoA acortada por dos carbonos con respecto al sustrato inicial. Las actividades enzimáticas requeridas para la betaoxidación son conocidas. La presente invención proporciona células huésped que poseen mayor actividad de la ruta catabólica para los ácidos grasos de cadena media (C4-C8) y larga (> C8), ácidos hidroxigrasos y diácidos en comparación con las células huésped control. Por ejemplo, en levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), la betaoxidación se produce, en el peroxisoma; los ejemplos de productos de ácido nucleico que afectan a la beta-oxidación en el peroxisoma son PAT1 y PEX11 de *Saccharomyces cerevisiae*. En algunas realizaciones de la invención, se proporciona una célula huésped modificada para aumentar la expresión de PAT1 y/o PEX11 para su uso en los procedimientos del presente documento para la producción de malonato. Esta modificación se ilustra en el Ejemplo 14.

#### **Modificaciones genéticas y condiciones de fermentación que aumentan la biosíntesis de malonil-CoA**

De acuerdo con la invención, se puede aumentar el título, el rendimiento y/o la productividad de malonato mediante el aumento de la biosíntesis de malonil-CoA, y la invención proporciona células huésped, vectores, enzimas y procedimientos relacionados con los mismos. La malonil-CoA se produce en las células huésped a través de la actividad de una acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2) que cataliza la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y dióxido de carbono. La invención proporciona células huésped recombinantes para producir malonato que expresa una acetil-CoA carboxilasa heteróloga (ACC). En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de *S. cerevisiae* que comprende acetil-CoA carboxilasa ACC1 heteróloga de *S. cerevisiae* o una enzima homóloga de la misma. En algunas realizaciones, la célula huésped modificada para la expresión heteróloga de una ACC, tal como ACC1 de *S. cerevisiae*, se modifica adicionalmente para eliminar la regulación postraduccional de ACC1 mediante la modificación genética de la proteína quinasa SNF1 de *S. cerevisiae* o una enzima homóloga de las mismas. La invención también proporciona una célula huésped recombinante adecuada para producir malonato de acuerdo con la invención que es una célula de *E. coli* que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica la expresión de proteínas del complejo de acetil-CoA carboxilasa de *S. cerevisiae* AccA, AccB, AccC y AccD o una o más enzimas homólogas de las mismas. De acuerdo con la invención, las acetil-CoA carboxilasas adicionales pueden expresarse de forma heteróloga para aumentar la biosíntesis de malonil-CoA y malonato. Esta modificación se ilustra en el Ejemplo 15.

En diversas realizaciones de la invención, la expresión de BirA, biotina-[acetilCoA carboxilasa] holoenzima sintetasa, se coexpresa con las proteínas del complejo de acetil-CoA carboxilasa de *E. coli*, AccA, AccB, AccC y AccD para mejorar la actividad del complejo ACC y dar como resultado un aumento en la producción de malonil-CoA y malonato. En diversas realizaciones de la invención, ACC1 de *S. cerevisiae* se modifica aún más para eliminar la regulación postraduccional de ACC1 mediante la introducción de mutaciones de serina a alanina en cualquiera, todos o cualquier combinación de los restos siguientes; S10, S233, S430, S1114, S1145, S1148, S1157, S1159, S1162, S1163, S1169. En algunas realizaciones de la invención, la acetil-CoA carboxilasa utilizada es de *Yarrowia lipolytica* CLIB122, denominada en el presente documento YIACC. El Ejemplo 42 ilustra cómo la inclusión de esta enzima en una cepa huésped productora de malonato proporcionada por la invención da como resultado una duplicación del título de malonato de ese huésped después de 120 horas de fermentación, con respecto al mismo huésped fermentado sin esta enzima. En realizaciones adicionales de la invención, esta enzima se coexpresa con una biotin-[acetil-CoA carboxilasa] holoenzima sintetasa, también derivado de este organismo (BPL1). En realizaciones adicionales de la invención, los genes que codifican las acetil-CoA carboxilasas y la biotin- [acetilCoA carboxilasa] holoenzima sintetasa son dtsR1 accBC y derivan de *Corynebacterium glutamicum*. En realizaciones adicionales de la invención, estos genes derivan de una cepa de levadura que incluye, pero sin limitaciones, los de los géneros, *Candida*, *Pichia* o cualquiera de las otras levaduras del presente documento. En diversas realizaciones de la invención, la célula huésped que produce malonato expresa cualquier combinación de estas enzimas acetil-CoA carboxilasas y biotin- [acetil-CoA carboxilasa] holoenzima sintetasa.

En algunas realizaciones de la invención, una célula huésped adecuada para producir malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención comprende modificaciones genéticas que afectan a la expresión y/o la actividad de proteínas implicadas en la biosíntesis de los ácidos grasos. La malonil-CoA es naturalmente un sustrato en la biosíntesis de los ácidos grasos y el desvío de malonil-CoA a la producción de ácidos grasos disminuye la capacidad de la célula huésped para producir malonato. La invención proporciona células huésped recombinantes para producir malonato que expresa un complejo multienzima heterólogo de ácido graso sintasa (FAS). Se conocen mutaciones sensibles a la temperatura del complejo de ácido graso sintetasa de *S. cerevisiae* (véase, Knobling y col., Eur. J. Biochem., 59:415-421 (1975)). La expresión de un complejo heterólogo de ácido graso sintasa sensible a la temperatura permite que el desvío de malonil-CoA a la biosíntesis de ácidos grasos sea controlado por la temperatura a la que se cultiva la célula huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de *S. cerevisiae* que comprende las ácido graso sintasas de *S. cerevisiae* FAS1 and FAS2 o enzimas homólogas de las mismas. En algunas realizaciones de la invención, las enzimas FAS 1 y FAS2 son enzimas FAS1 o FAS2 sensibles a la temperatura.

Además de la modificación genética de la célula huésped, la biosíntesis de ácidos grasos puede disminuirse mediante la adición de un inhibidor de FAS a los medios de cultivo celular. Por ejemplo, el inhibidor de FAS cerulenina forma un enlace covalente con la cisteína C1305 del sitio activo en el dominio de cetoacil sintasa de *S. cerevisiae* del complejo FAS, inhibiendo la actividad enzimática (Johansson y col., PNAS, 105:12803-12808 (2008)). La cerulenina no solo es eficaz para inhibir la actividad FAS de *S. cerevisiae*, pero generalmente es un inhibidor de los complejos FAS que contienen una tríada catalítica Cys-His-His o Cys-His-Asn en el dominio de la cetoacil sintasa. En algunas realizaciones, la cerulenina se añade al caldo de fermentación a una concentración final entre 5 mg/l y 100 mg/l para inhibir la biosíntesis de ácidos grasos y aumentar la producción de malonato en células huésped recombinantes que producen malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención. En diversas realizaciones de un procedimiento de la invención, se añade un inhibidor de FAS al caldo de fermentación que contiene células huésped recombinantes que producen malonato. En algunas realizaciones de un procedimiento de la invención, el inhibidor de FAS es cerulenina, como se ilustra en el Ejemplo 16. En algunas realizaciones del procedimiento de la invención, la cerulenina se complementa en el caldo de fermentación a una concentración entre 5 mg/l y 100 mg/l. En otras realizaciones de un procedimiento de la invención, el inhibidor del complejo de ácido graso sintasa se selecciona de un grupo que consiste en platensimicina, tiolactomicina y triclosán.

Uno de los sustratos para la acetil-CoA carboxilasa es dióxido de carbono y el aumento de la presión parcial del dióxido de carbono en el caldo de fermentación estimula la formación de malonil-CoA. El caldo de fermentación debe contener una presión mínima de dióxido de carbono disuelto de 0,01 atmósferas y es deseable un aumento de la presión parcial de dióxido de carbono disuelto por encima de este umbral. El caldo de fermentación debe contener típicamente entre 0,1 y 1 atmósferas de presión parcial de dióxido de carbono disuelto. La presión parcial de dióxido de carbono disuelto en el caldo de fermentación se puede aumentar a por encima de las condiciones de saturación o por encima de 1 atmósfera de dióxido de carbono disuelto. En algunas realizaciones de un procedimiento de la invención, la presión parcial de dióxido de carbono disuelto en el caldo de fermentación se incrementa a entre 0,1 y 1 atmósferas. En algunas realizaciones del procedimiento de la invención, la presión parcial de dióxido de carbono se incrementa mediante la adición de carbonatos o bicarbonatos al caldo de fermentación. Por ejemplo, y sin limitación, se puede añadir carbonato de calcio al caldo de fermentación para aumentar la presión parcial de dióxido de carbono disuelto. En otras realizaciones del procedimiento de la invención, la fermentación se realiza en un recipiente presurizado que contiene dióxido de carbono a por encima de la presión atmosférica. En otras realizaciones del procedimiento de la invención, el gas dióxido de carbono se pulveriza en el caldo de fermentación. La mezcla de gases que se pulveriza puede contener otros gases si los componentes añadidos no interfieren e el crecimiento de la célula huésped o la producción de malonato. Puede ser ventajoso colocalizar la fuente del dióxido de carbono gaseoso con la fermentación de malonato. Por ejemplo, y sin limitación, el dióxido de carbono gaseoso

resultante de diversos procedimientos de fermentación (por ejemplo, etanol, isobutanol, 3-hidroxipropionato), procedimientos químicos (por ejemplo, química sintética del malonato corriente abajo) o generación de energía (por ejemplo, centrales de carbón o gas natural) pueden bombearse al caldo de fermentación desde las células huésped que producen malonato para aumentar la presión parcial del dióxido de carbono, como se ilustra en el Ejemplo 17.

#### 5 **Modificaciones genéticas que disminuyen el catabolismo del malonato**

De acuerdo con la invención, se puede lograr un mayor título, rendimiento y/o productividad del malonato disminuyendo el catabolismo del malonato, y la invención proporciona células huésped, vectores, enzimas y procedimientos relacionados con los mismos. Una vía metabólica por la cual el malonato se cataboliza en una célula huésped es a través de la actividad de una acil-CoA sintetasa que cataliza la conversión de malonato y coenzima A en malonil-CoA. En algunas realizaciones de la invención, una célula huésped recombinante adecuada para producir malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención comprende una modificación genética que resulta en la delección, atenuación o modificación de uno o más ácidos nucleicos que codifican una acil-CoA sintetasa. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped recombinante es levadura y la una o más acil-CoA sintetasas se seleccionan del grupo que consiste en FAA1, FAA2, FAA3, FAA4, LSC1 y LSC2. En otras realizaciones de la invención, la célula huésped recombinante es *E. coli* y la una o más acil-CoA sintetasas se seleccionan del grupo que consiste en FadD, FadK, FadI, SucC, SucD y YahF. Este aspecto de la invención se ilustra en el Ejemplo 18.

#### **Modificaciones genéticas que aumentan la secreción de malonato de la célula huésped**

De acuerdo con la invención, se puede lograr un mayor título, rendimiento y/o productividad aumentando el transporte de malonato en el caldo de fermentación y la invención proporciona células huésped, materiales y procedimientos relacionados con los mismos. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped recombinante adecuada para uso en los procedimientos de la invención es una célula de *S. cerevisiae* que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica la expresión de una proteína de transporte de *S. cerevisiae* seleccionada del grupo que consiste en PDR5, PDR10, PDR11, PDR12, PDR15 y PDR18. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped recombinante adecuada para producir malonato de acuerdo con los procedimientos de la invención es una célula de *E. coli* que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica la expresión de DcuC de *E. coli*. Este aspecto de la invención se ilustra en el Ejemplo 19.

#### **Modificaciones genéticas que aumentan la tolerancia de la célula huésped al malonato**

De acuerdo con la invención, se puede lograr un mayor título, rendimiento y/o productividad de malonato aumentando la tolerancia de la célula huésped al malonato y la invención proporciona células huésped, materiales y procedimientos relacionados con los mismos. Las altas concentraciones de malonato pueden inhibir competitivamente la actividad de la succinato deshidrogenasa (EC 1.3.5.1) (véase, Slater, *Methods Enzymol.* 10:48-57 (1967)). La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las enzimas succinato deshidrogenasa mutantes exhiben una inhibición competitiva más baja por el malonato. Por ejemplo, los restos de succinato deshidrogenasa SDH1 de *S. cerevisiae* E300, R331 y R442 son importantes para el reconocimiento del sustrato (por ejemplo, succinato). Aumentar el tamaño del sitio activo de SDH1 disminuye la inhibición competitiva del malonato y al mismo tiempo permite que la enzima mantenga su actividad hacia el sustrato nativo, succinato. En concreto, la introducción de una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en E300D, R331K o R331H, y R442K y R442H disminuye la inhibición competitiva de SDH1 por malonato. En algunas realizaciones, una célula huésped recombinante que expresa un SDH1 con mutación puntual R300D se usa para producir malonato de acuerdo con la invención. En otras realizaciones, se usa una célula huésped recombinante que expresa una SDH1 con una mutación puntual R331K o R331H para producir malonato de acuerdo con la invención. En otras realizaciones, se usa una célula huésped recombinante que expresa una SDH1 con una mutación puntual R442K o R442H para producir malonato de acuerdo con la invención. Este aspecto de la invención se ilustra en el Ejemplo 20.

#### **Modificaciones genéticas que aumentan el catabolismo de varias fuentes de carbono**

En los procedimientos de la invención, se usan materias primas de carbono para la producción de malonato. Las fuentes de carbono adecuadas incluyen, sin limitación, las seleccionadas del grupo que consiste en azúcares purificados (por ejemplo, dextrosa, sacarosa, xilosa, arabinosa, lactosa); azúcares mixtos derivados de plantas (por ejemplo, caña de azúcar, sorgo dulce, melazas, almidón de maíz, almidón de patata, azúcar de remolacha, trigo), aceites vegetales, ácidos grasos, glicerol, biomasa celulósica, alginato, etanol, dióxido de carbono, metanol y gas sintético ("gas de síntesis"). Una célula huésped dada puede catabolizar una materia prima particular de manera eficiente o ineficiente. Si una célula huésped cataboliza ineficientemente una materia prima, se puede modificar la célula huésped para mejorar o crear una ruta catabólica para esa materia prima. Por ejemplo, El ejemplo 47 muestra la producción de malonato, de acuerdo con la invención, de varias fuentes de carbono diferentes que utilizan *Pichia kudriavzevii* como la cepa huésped. Si bien este organismo no cataboliza la sacarosa en las condiciones probadas, la invención proporciona la introducción de una sacarosa invertasa (beta-fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26) para facilitar el uso de esta fuente de carbono. El ejemplo 30 también demuestra la producción de ácido malónico de acuerdo con los procedimientos de la invención utilizando diversas fuentes de carbono. Realizaciones adicionales de la invención incluyen el uso de cepas huésped que catabolizan metanol. En algunas realizaciones, el huésped es una cepa de levadura. En algunas realizaciones, el huésped se selecciona de *Komagataella pastoris*, *Pichia*

methanolica o *Pichia pastoris*.

La invención proporciona células huésped que comprenden modificaciones genéticas que aumentan el título, el rendimiento y/o la productividad a través del incremento de la capacidad para catabolizar las fuentes de carbono no nativas. Las células de *S. cerevisiae* de tipo salvaje no pueden catabolizar azúcares pentosas, biomasa lignocelulósica o materia prima de alginato. En algunas realizaciones, la invención proporciona una célula de *S. cerevisiae* que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica enzimas que permiten el catabolismo de azúcares pentosas útiles en la producción de malonato como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica enzimas que permiten el catabolismo de las materias primas lignocelulósicas. En aún otras realizaciones de la invención, el ácido nucleico heterólogo codifica enzimas que aumentan el catabolismo de las materias primas de alginato.

Los expertos en la materia reconocerán que se pueden usar manipulaciones individuales para aumentar la producción de malonato a partir de una célula huésped determinada en una combinación virtualmente ilimitada y a menudo confieren beneficios similares que dan como resultado un rendimiento de malonato mucho mayor que en una sola manipulación y, en casos, la suma de las manipulaciones individuales. Por lo tanto, la invención abarca no solo las manipulaciones individuales descritas en el presente documento, también se materializa en cualquier combinación de estas perturbaciones que dan como resultado un incremento del ácido malónico producido por la cepa huésped.

### **Sección 6: Detección de células huésped productoras de malonato y detección de células huésped para mejorar la producción de malonato**

También se desvela un sistema biosensor de factor de transcripción que se puede usar para la detección precisa de malonato en medios líquidos. En muchas aplicaciones, este sistema se utiliza para detectar el malonato producido dentro de una célula huésped mediante la detección de la presencia de malonato en los medios de fermentación que contienen la célula huésped que produce malonato. "Detección precisa" se refiere a la detección de la presencia y/o la determinación directa o indirecta de la concentración de malonato; por lo tanto, detección con precisión del malonato, esto tiene aplicación en la mejora de la cepa, es decir, para aumentar la producción de malonato en las células huésped. En este sistema, el malonato se une a un resto de proteína presente en un factor de transcripción. La unión de malonato al resto de unión de malonato da como resultado la unión del factor de transcripción al promotor que se activa mediante el factor de transcripción, o, en algunas realizaciones, da como resultado la desrepresión del promotor por el factor de transcripción unido a malonato.

Cualquier número de factores de transcripción que se unen a malonato, o se activan para unirse a un promotor, en respuesta a una señal generada por la unión de malonato a un resto de unión, son adecuados para su uso en este sistema.

El factor de transcripción puede unirse al malonato, lo que da como resultado la unión del factor de transcripción a un promotor afin y la activación de un gen que está unido operativamente al promotor. Los ejemplos de factores de transcripción que se unen a malonato incluyen los factores de transcripción MdcY de *Acinetobacter calcoaceticus* (SEQ ID NO:3), MatR de *Rhizobium leguminosarum* (SEQ ID NO:4), MauR de *Klebsiella pneumoniae* (SEQ ID NO:5), y homólogos de los mismos.

Un factor de transcripción adecuado es un factor de transcripción MdcY. Un factor de transcripción MdcY puede unirse directamente a malonato y regular la transcripción mediada por promotores, tales como  $P_{MdcL}$ . Los promotores sensibles a MdcY y MdcY son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Koo y col., J Bacteriol. 182:6382-6390 (2000)).

Un ejemplo de una secuencia polipeptídica de MdcY de *Acinetobacter calcoaceticus* se proporciona en la SEC ID NO: 3. Los polipéptidos MdcY que pueden emplearse de acuerdo con la invención incluyen variantes y homólogos de la secuencia del polipéptido MdcY expuesta en la SEC ID NO: 3. Por lo tanto, un polipéptido del factor de transcripción MdcY puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 % de identidad, típicamente al menos un 75 %, 90 %, 95 %, 99 % o mayor identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente en una región de al menos 100 o más aminoácidos, o al menos 200 o más aminoácidos o en toda la longitud del polipéptido completo, con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3. Un experto en la técnica entiende, a la vista de esta descripción, que también pueden emplearse variantes, por ejemplo, usando las secuencias conocidas como guía para seleccionar sustituciones de aminoácidos que no resultarán en pérdida de función.

El factor de transcripción MdcY puede estar presente de forma natural en una célula huésped, o una célula huésped puede modificarse genéticamente para expresar un factor de transcripción extraño mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo que codifica el factor de transcripción malonato en la célula huésped. Además, la célula huésped modificada genéticamente que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica el factor de transcripción malonato puede ser una célula huésped de *E. coli*.

El factor de transcripción MdcY puede unirse a una serie de promotores y activar la expresión de un gen operativamente unido al promotor. Un ejemplo de un promotor sensible a MdcY adecuado para su uso de acuerdo con la invención se proporciona en la SEC ID NO: 6. En algunas realizaciones, un promotor sensible a MdcY para su

uso en la invención, típicamente comprende una secuencia de operador ATTGTATACAAT. En algunas realizaciones, el promotor es al menos un 75 % idéntico a la secuencia del promotor que se muestra en la SEC ID NO: 6. En algunas realizaciones, el promotor comprende una subsecuencia de la SEC ID NO: 6 que comprende 10, 20, 25, 30, 35 o más, nucleótidos contiguos de la SEC ID NO:6.

5 También se desvela un procedimiento para detectar con precisión el malonato. La etapa de detección comprende la detección, por ejemplo, medir la cantidad de un producto génico de un gen indicador o marcador (por ejemplo, un gen indicador fluorescente). El producto génico del gen indicador influye en la tasa de crecimiento de una célula huésped que comprende los componentes de un biosensor del factor de transcripción de malonato como se ha descrito anteriormente. El producto génico del gen indicador hace que la célula huésped modificada se vuelva  
10 resistente o sensible a un compuesto. Por ejemplo, el gen indicador es un gen de resistencia a los antibióticos (por ejemplo, un gen *tetA*) en el que la presencia de malonato en el medio de cultivo induce resistencia a los antibióticos de modo que la célula huésped presenta un crecimiento mejorado en presencia de malonato cuando el antibiótico está presente, como se ilustra en el Ejemplo 21. Una célula huésped que comprende los componentes de un biosensor de factor de transcripción como se describe anteriormente es una célula huésped que es capaz de  
15 producir malonato. El Ejemplo 36 ilustra la práctica de este aspecto de la invención utilizando tanto la resistencia a los antibióticos (*tetA*) como una señal colorimétrica (*lacZ*) como salidas que están correlacionadas con la concentración de ácido malónico, producido de acuerdo con el procedimiento de los primeros aspectos de la invención, en medio de fermentación.

De manera general, a continuación, se desvela un procedimiento para cribar o seleccionar una célula huésped que produce malonato, que comprende: (a) proporcionar una célula huésped modificada de la presente invención, (b) cultivar la célula huésped, y (c) cribar o seleccionar la célula huésped en función de la expresión del gen indicador por la célula huésped.  
20

El procedimiento para cribar o seleccionar una célula huésped que produce malonato comprende: (a) proporcionar una pluralidad de células huésped modificadas de la presente invención en las que las células huésped modificadas de diferentes modificaciones están en cultivos separados, (b) cultivar cada cultivo separado de la célula huésped, (c) cribar o seleccionar la célula huésped basándose en la expresión del gen indicador por la célula huésped, y (d) comparar la expresión de los genes indicadores de los cultivos separados. En particular, la etapa (d) puede comprender identificar uno o más cultivos y/o la célula huésped correspondiente, que tienen una expresión aumentada del producto génico del gen indicador. Los expertos en la técnica reconocerán que estos cultivos surgen de un solo transformante y representan una población clonal.  
25  
30

Además, se desvela un procedimiento para seleccionar una célula huésped que produce malonato, en el que la selección es una selección positiva. En una selección positiva, la etapa de selección selecciona las células huésped que tienen una mayor expresión de un gen indicador que aumenta la probabilidad de permanecer viables y duplicarse, y por lo tanto tienen una mayor probabilidad de permanecer viables y duplicarse. Por ejemplo, las células huésped que producen malonato seguirán siendo viables y se propagarán a una velocidad más rápida que las células huésped que no producen malonato. De forma similar, las células huésped con una mayor producción de malonato en comparación con una cepa de control se propagarán a una velocidad más rápida que la cepa de control.  
35

En particular, el procedimiento para seleccionar una célula huésped de *E. coli* que produce malonato comprende: (a) proporcionar una pluralidad de células huésped de *E. coli* modificadas de la presente invención en las que las células huésped modificadas de diferentes modificaciones están en cultivos separados, (b) cultivar cada cultivo separado de la célula huésped, (c) seleccionar de forma positiva la célula huésped basada en la expresión del gen indicador por la célula huésped, y (d) comparar la expresión de los genes indicadores de los cultivos separados.  
40

En particular, el procedimiento para seleccionar una célula huésped de *E. coli* que produce malonato comprende: (a) proporcionar una pluralidad de células huésped de *E. coli* modificadas de la presente invención en las que las células huésped modificadas de diferentes modificaciones están en el mismo cultivo, (b) cultivar la mezcla heterogénea de células huésped modificadas en un medio de crecimiento que contiene un agente de selección positivo tal que las células huésped que exhiben una mayor producción de malonato que la pluralidad de células huésped se propagarán a una velocidad más rápida que las células huésped que presentan una menor producción de malonato y (d) aislar las células huésped que exhiben la mayor producción de malonato.  
45  
50

### Sección 7: Purificación de malonato

Además, se desvelan procedimientos para purificar malonato a partir del caldo de fermentación, comprendiendo los procedimientos: (a) cultivar una célula huésped en condiciones adecuadas para la producción de malonato, (b) y recuperar (es decir, purificar) el malonato del caldo de fermentación. También se desvela el malonato purificado producido de acuerdo con los procedimientos de la invención. El malonato biosintetizado puede producirse intracelularmente y/o secretarse en el medio de cultivo. El malonato producido intracelularmente se secreta típicamente en el medio de cultivo usando un transportador de membrana, como se ha descrito anteriormente. El malonato no secretado puede eliminarse de la célula huésped por medio de lisis celular química, enzimática o mecánica. El malonato se puede recuperar de las células, del caldo de fermentación, o de ambos. Si la célula está  
55

diseñada para secretar malonato, se puede optar por recuperar el malonato solo del caldo de fermentación o se puede optar por recuperarlo tanto del medio como de la célula (es decir, lisando la célula). Si la célula no está diseñada para secretar malonato, se puede lisar la célula huésped para aislar el malonato en ella.

Además se desvelan procedimientos para aislar el malonato producido biológicamente. Como se utiliza en el presente documento, "aislar", "purificar" y "recuperar" se utilizan para hacer referencia a la separación del malonato de otras sustancias presentes. "Aislamiento", "purificación" o "recuperación", como se usa en este contexto, pretende transmitir una preparación de malonato enriquecido en malonato en relación con la célula o el caldo de fermentación que lo produjo, pero que puede o no ser sustancialmente (es decir, más de 50 %) puro en peso/peso (p/p). Aislar el malonato de acuerdo con estos procedimientos implica separar el malonato producido de al menos parte o la totalidad del medio de fermentación, células huésped y partes de los mismos, a partir de las que se produce malonato. El malonato se puede purificar, es decir, a una pureza de más del 50 % en peso/peso, de acuerdo con la invención del caldo de fermentación y/o de la célula productora en la cual cualquier célula huésped natural o recombinante (por ejemplo, *E. coli*, *S. cerevisiae*, levadura oleaginoso, y similares) que producen malonato se cultiva, es decir, la célula huésped no está limitada a una célula huésped recombinante de la invención. El malonato aislado puede estar libre o esencialmente libre de impurezas de las células huésped. El malonato se aísla o se purifica en un grado tal que cualquier impureza presente no interfiera en el uso posterior del malonato. Por ejemplo, si el uso posterior es como una sustancia química industrial, tal como una sustancia química para su uso en una reacción de polimerización, el malonato está esencialmente libre de impurezas cuando las impurezas restantes no interfieren con el uso del malonato en una reacción de polimerización. Normalmente, el malonato utilizado para las reacciones de polimerización tiene una pureza de al menos el 95 % en p/p o superior. Si el malonato se va a utilizar como combustible, tal como un combustible para su uso en una reacción de combustión, el compuesto está esencialmente libre de impurezas cuando cualquier impureza restante no interfiera con el uso del malonato como combustible. Si el malonato se utiliza como alimento para animales, el malonato está esencialmente libre de impurezas cuando las impurezas restantes no interfieren con el uso del material como alimento para animales. Cuando el malonato se usa como alimento para animales, se puede optar por recuperar la biomasa que contiene malonato del caldo de fermentación y utilizar la biomasa como alimento para animales.

En algunas realizaciones de los procedimientos de purificación, el caldo de fermentación se concentra para aumentar la concentración de malonato y disminuir el volumen de líquido que requiere procesamiento. En particular, esta concentración se logra por evaporación, incluyendo vacío y calor, ósmosis inversa, deshidratación de membrana de "paso alto" y/o evaporación en película fina.

Los procedimientos de purificación desvelados comprenden la etapa de recuperar el malonato producido, en el que la etapa de recuperación es concurrente o posterior a la etapa de cultivo. El malonato se purifica a partir del caldo de fermentación y las células huésped. En otras realizaciones, las células huésped se separan del caldo de fermentación, se lisan y luego se recupera el malonato de las células huésped. En otras realizaciones, las células huésped se lisan en el caldo de fermentación y el malonato se recupera de las células lisadas y el caldo de fermentación. Un procedimiento para recuperar el malonato del caldo de fermentación es la precipitación de malonato con un catión. En particular, este es un catión monovalente o es un catión divalente. Típicamente, el catión se añade al caldo de fermentación (o lisado) como una sal. Por ejemplo, precipitación de malonato de calcio en una solución acuosa, que puede ser caldo de fermentación o un lisado celular o una mezcla de ambos, que contiene malonato de acuerdo con la invención se logra mediante la adición de una sal de calcio (Weiner, Org. Synth. 18:50 (1938); Weiner, Org. Synth. Coll. 2:376 (1943)). Varias sales de calcio (por ejemplo, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, cloruro de calcio) pueden usarse de acuerdo con la invención para precipitar malonato a partir de caldo de fermentación.

Se forma una sal de malonato de calcio cuando los dos ácidos carboxílicos de malonato no están protonados y el calcio está presente en el caldo de fermentación. El malonato de calcio es insoluble en soluciones acuosas, por ejemplo, caldo de fermentación, precipitará y luego se puede recuperar del caldo de fermentación. Los valores de  $pK_a$  de los dos restos de malonato de ácido carboxílico son 2,83 y 5,69; por lo tanto, cuando el pH del caldo de fermentación está por debajo de 5,7, no se forma malonato de calcio y el malonato permanece disuelto en el caldo de fermentación. Cuando el pH del caldo de fermentación está por encima de 5,7, el malonato de calcio puede formarse y precipitará del caldo de fermentación. Los ácidos carboxílicos son ácidos débiles y la acumulación de malonato en el caldo de fermentación disminuirá el pH, y si el pH cae por debajo de 5,7, la adición de cationes de calcio no produce la formación de malonato de calcio. Un procedimiento para purificar el malonato del caldo de fermentación es añadir una sal de calcio cuando el anión de la sal de calcio es una base (es decir, carbonato de calcio e hidróxido de calcio) y la adición de la sal de calcio aumenta y/o mantiene el caldo de fermentación con un pH superior a 5,7. En particular, se añade hidróxido de calcio al caldo de fermentación para alcanzar/mantener un pH entre 5,69 y 7,5 y precipitar malonato de calcio. En un segundo procedimiento, se añade carbonato de calcio al medio de fermentación para alcanzar/mantener un pH entre 5,69 y 7,5 y precipitar malonato de calcio. En un tercer procedimiento, se añade cloruro de calcio al caldo de fermentación cuando el pH del caldo de fermentación está entre 5,69 y 7,5, y precipita malonato de calcio. De acuerdo con los procedimientos anteriores, se pueden añadir otras sales de calcio al caldo de fermentación para precipitar el malonato. La adición de carbonato de calcio tiene la ventaja adicional de aumentar la presión parcial de dióxido de carbono en el caldo de fermentación, estimulando la formación de malonil-CoA a través de la actividad de la acetil-CoA carboxilasa, descrito anteriormente. El Ejemplo 23 ilustra este aspecto de la invención describiendo la purificación de malonato usando una sal de calcio.

Se puede añadir la sal de calcio al comienzo de la fermentación (es decir, antes de que se haya acumulado malonato sustancial), durante la fermentación, o al final de la fermentación. En algunas realizaciones, se agrega carbonato de calcio o hidróxido de calcio al caldo de fermentación antes de que las células huésped hayan comenzado a producir malonato. En otras realizaciones, se añade carbonato de calcio o hidróxido de calcio al caldo de fermentación antes de que las concentraciones de malonato superen los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 o 50 g/l. En otras realizaciones, se añade carbonato de calcio o hidróxido de calcio al caldo de fermentación al final de la fermentación. Se puede optar por recuperar el precipitado de malonato de calcio del caldo de fermentación concurrente o posterior a la fermentación.

Debido a que la solubilidad del monohidrato de malonato de calcio disminuye al aumentar la temperatura, la recuperación de malonato del caldo de fermentación se puede aumentar elevando la temperatura entre 50 °C y 100 °C durante la etapa de recuperación. En algunas realizaciones del procedimiento de la invención, una sal de calcio (es decir, carbonato de calcio, hidróxido de calcio y/o cloruro de calcio) se añade al caldo de fermentación, la temperatura se incrementa a entre 50 °C y 100 °C, y el malonato se recupera del caldo de fermentación. En realizaciones adicionales de la invención, la temperatura se incrementa por encima de los 100 °C. Sin embargo, la descomposición térmica del ácido malónico se puede producir a temperaturas de alrededor de 100 °C, por consiguiente, aumentar la temperatura a o por encima de 100 °C puede afectar negativamente al rendimiento.

En particular, el malonato se puede purificar de los medios de producción mediante precipitación con un catión monovalente. Típicamente, el catión monovalente se añade al caldo de fermentación (o lisado) como una sal. Por ejemplo, la precipitación de malonato de sodio en una solución acuosa, que puede ser caldo de fermentación o un lisado celular o una mezcla de ambos, que contiene malonato de acuerdo con la invención se logra mediante la adición de una sal de sodio. Varias sales de sodio (por ejemplo, hidróxido sódico, carbonato de sodio, cloruro de sodio) se puede usar de acuerdo con la invención para precipitar malonato del caldo de fermentación. Una sal de malonato de sodio se forma cuando, cuando dos ácidos carboxílicos de malonato no están protonados y el sodio está presente en el caldo de fermentación. El malonato de sodio es soluble en soluciones acuosas, por ejemplo, caldo de fermentación, pero puede forzarse la salida de la solución aumentando el pH del medio por encima del pKa más alto del ácido malónico (5,69); véase el Ejemplo 32. La precipitación adicional del malonato de sodio se logra aumentando la concentración de los iones por evaporación del disolvente (agua). Al igual que con los aspectos de la invención asociados con la precipitación de malonato de calcio, la adición de sales de sodio que contienen una base (por ejemplo, hidróxido de sodio o carbonato de sodio) se puede usar para mantener el pH del caldo de fermentación por encima de 5,7, facilitando así la precipitación de la sal sódica. La separación del precipitado del caldo de fermentación proporciona malonato purificado de acuerdo con la invención.

Otro procedimiento para aislar el malonato del caldo de fermentación es a través de la extracción reactiva con una amina alifática, primaria secundaria o terciaria o un alcohol primario, secundario o terciario. Este procedimiento surge en parte del descubrimiento de que tanto los alcoholes primarios como las aminas terciarias son agentes altamente efectivos para la eliminación selectiva de malonato del caldo de fermentación, como se ilustra en los Ejemplos 24-26, 36-41. En particular, el malonato se puede purificar a partir del caldo de fermentación mediante extracción reactiva con trioctilamina en un disolvente orgánico. Además, el malonato se puede purificar del caldo de fermentación utilizando una amina terciaria seleccionada del grupo que consiste en trietilamina, tripropilamina, tributilamina, tripentilamina, trihexilamina, triheptilamina, trionilamina y tridecilamina. El compuesto amina puede ser amoníaco, o puede ser una dialquilamina que incluye dietilamina, dipropilamina, diisopropilamina, dibutilamina, dipentilamina, dihexilamina, diheptilamina, dioctilamina, dinonilamina, didecilamina. El ejemplo 33 demuestra el aislamiento de malonato a partir de caldo de fermentación usando dietilamina. En particular, el compuesto amino se agrega junto con un disolvente orgánico o mezcla de disolventes, incluyendo: pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol, hexano, decano, éteres, acetato de etilo o cualquier combinación de los mismos. En particular, el disolvente puede ser alcano ramificado o no ramificado, alcohol, diol éster, éter, diéter o lactona que contiene de cuatro a veinte carbonos. La adición de disolventes facilita la transferencia de compuestos amino a la fase acuosa y los malonatos coordinados con amina a la fase orgánica, mejorando así la purificación.

Se pueden ajustar varios parámetros para mejorar la extracción de malonato. La longitud de grupos alquilo, la fuerza iónica del caldo de fermentación, el pH, los equivalentes molares de trialkilaminas, la temperatura y el codisolvente tienen un impacto sobre la eficiencia de la extracción de las trialkilaminas. El impacto de la longitud del grupo alquilo se ilustra en el ejemplo 36. Cada uno de tripropilamina, trihexilo y trioctilamina son cada una capaces de aislar el ácido malónico de la fase acuosa y solubilizarlo en la fase orgánica de 1 octanol de acuerdo con la invención. La eficiencia de extracción de trioctilamina > trihexilamina > tripropilamina, lo que indica la longitud más larga de estas cadenas es la realización preferente (para alto rendimiento) de la invención a pH bajo, con un codisolvente de 1 octanol.

Como con la precipitación en sales, el pH tiene un impacto en la extracción de ácido malónico de una fase acuosa cuando se usan trialkilaminas. La extracción de trialkilamina tiene la mayor eficiencia cuando ambos restos ácidos están carboxilados. El ejemplo 37 muestra las eficiencias de extracción de trioctilamina en un intervalo de valores de pH. El nivel más alto de extracción se produce a pH 1,5 y disminuye a medida que aumenta el pH. Por encima del segundo pKa del ácido malónico (5,69), prácticamente no hay extracción. Aunque la invención proporciona extracción de malonato de una fase acuosa utilizando trialkilaminas sin limitación de pH, se prefieren las realizaciones a pH de 2,0 o menor para una máxima eficiencia. El crecimiento de la células huésped y la producción

de malonato a un pH bajo, como se ilustra en el Ejemplo 48, facilita la protonación de malonato para mejorar la extracción con trialquilaminas. En otras realizaciones de la invención, se añade ácido exógeno para facilitar esta protonación.

Se pueden usar diferentes concentraciones de trialquilamina. Como se indica en el Ejemplo 38, se observó una relación lineal entre la eficiencia de extracción y la fracción molar de trioctilamina: ácido malónico; específicamente, la relación lineal existente entre las fracciones molares de trioctilamina: ácido malónico de 0 a 1. Por encima de una relación molar de 1, el 100% del ácido malónico se extrajo en la fase orgánica. Por lo tanto, para maximizar la eficiencia de extracción, la cantidad de trialquilamina en la fase orgánica debe ser equimolar a la cantidad de ácido malónico en la fase acuosa (por ejemplo, caldo de fermentación). Idealmente, se añadirá una cantidad mayor que la cantidad equimolar de trialquilamina a la fase orgánica para compensar la disminución de las eficiencias de extracción debido a otros ácidos orgánicos y aniones en el caldo de fermentación.

Como se ilustra en el Ejemplo 39, la eficiencia de la extracción de trialquilamina del ácido malónico se ve afectada negativamente al aumentar la fuerza iónica (concentración de sal) de la fase acuosa. La desalinización de varios iones se puede lograr a través de varios procedimientos, incluyendo: la adición de otros agentes para generar una sal insoluble, ajuste del pH, y/o paso a través de diversas membranas.

En particular, la extracción reactiva puede ser una esterificación por Fischer de malonato en uno o ambos ácidos carboxílicos con un alcohol en presencia de un catalizador ácido para dar como resultado la formación de ésteres de malonato de monoalquilo y dialquilo, respectivamente. Por ejemplo, el malonato de dietilo se puede producir mediante esterificación por Fischer del malonato usando etanol. Los ésteres de malonato de monoalquilo y dialquilamino tienen baja solubilidad en soluciones acuosas y baja volatilidad, permitiendo que los ésteres de malonato se separen del agua y otros componentes volátiles en el caldo de fermentación por destilación. En diversas realizaciones de la invención, la separación de los ésteres se logra mediante la división en fases en un disolvente orgánico. En general, un alcohol alifático primario o secundario es adecuado para la esterificación de Fischer con malonato; por ejemplo, y sin limitación, el alcohol puede seleccionarse del grupo que consiste en metanol (N.º CAS 67-56-1), etanol (N.º CAS 64-17-5), 1-propanol (N.º CAS 71-23-8), 1-butanol (N.º CAS 71-36-3), isopropanol (N.º CAS 67-64-0) e isobutanol (N.º CAS 78-83-1), entre otros. Un número de catalizadores ácidos son adecuados para la esterificación por Fischer de un alcohol con malonato; por ejemplo, el catalizador ácido puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido fólico, triflato de escandio (III), N, N'-díciclohexilcarbodiimida y tribromuro de tetrabutilamonio. En diversas realizaciones de la invención, el malonato se purifica a partir del caldo de fermentación mediante destilación reactiva usando etanol para convertir el malonato en malonato de dietilo. En otras realizaciones de la invención, el malonato se purifica del caldo de fermentación por destilación reactiva utilizando metanol para convertir el malonato en malonato de dimetilo. En diversas realizaciones de la invención, el catalizador ácido es ácido sulfúrico.

Como se ilustra en los Ejemplos 41, la esterificación de Fischer en etanol usando ácido sulfúrico como catalizador puede dar como resultado una purificación > 99 % del ácido malónico a partir de una fase acuosa. En diversas realizaciones de la invención, el exceso de etanol utilizado en este procedimiento se recupera a presión reducida y se recicla para su uso en lotes de fermentación posteriores. En varias otras realizaciones de la invención, el catalizador está basado en la matriz (por ejemplo, resinas de amberlita) y se recupera, recargado, y reutilizado en lotes posteriores.

La economía de la purificación de malonato mediante esterificación de Fischer puede mejorarse de acuerdo con la invención mediante la colocación de la biorrefinería de malonato con una biorrefinería de alcohol o refinería química (utilizada aquí para referirse a la producción de alcohol a partir de materias primas renovables o de petróleo utilizando química sintética y no un procedimiento de fermentación). En algunas realizaciones de la invención, una biorrefinería de malonato se localiza junto con una biorrefinería de alcohol o una refinería química para reducir el costo de la síntesis de ésteres de malonato de monoalquilo o dialquilo. En algunas realizaciones de la invención, el alcohol resultante de la biorrefinería o refinería química es de una pureza inferior a la que se vende y distribuye normalmente para aplicaciones químicas y/o de combustible.

El procedimiento para aislar el malonato del caldo de fermentación implica la extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico. Los valores de  $pK_a$  de los dos restos de malonato de ácido carboxílico son 2,83 y 5,69; por lo tanto, cuando el pH del medio se reduce por debajo de 2,8, más del 50 % de las moléculas no están ionizadas. La afinidad de estas especies es mayor para el disolvente orgánico que para el caldo de fermentación acuoso. La separación de estas moléculas en la fase orgánica sirve para impulsar el equilibrio hacia las especies protonadas y, por lo tanto, progresivamente hacia el disolvente orgánico. En algunas realizaciones de la invención, el pH ácido del caldo es el resultado de las condiciones de fermentación. En otras realizaciones de la invención, el pH se reduce a la acidez apropiada mediante la adición de un ácido. En diversas realizaciones de la invención, el disolvente se selecciona del grupo que consiste en acetato de etilo, diclorometano, dicloroetano, decano, dodecano, hexanos, octanol, pentanol o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones de la invención, el crecimiento de la célula huésped y la producción de malonato a un pH bajo facilitan la protonación del malonato para mejorar la solubilidad del malonato en el disolvente orgánico. En otras realizaciones de la invención, se añade ácido exógeno para facilitar esta protonación. En algunas realizaciones de la invención, el disolvente se elimina (total o parcialmente) por destilación al vacío. En diversas realizaciones de la invención, el ácido malónico concentrado se esterifica a un

alcohol, como se describe en otra parte, y el éster se purifica por destilación.

Además, el malonato se puede eliminar del caldo de fermentación mediante la unión a una resina de intercambio iónico. La resina se puede seleccionar de entre las siguientes: Lewatit® VP OC 1065, forma de cloruro de Lewatit® MP-64, Toyopearl®, base libre Dowex® 66, base libre Amberlite® IRA-67, base libre Amberlite® IRA-96, forma de cloruro Amberjet® 4200, forma de cloruro Lewatit® MonoPlus M 500, forma de cloruro Dowex® 1X8, forma de hidróxido de Amberlyst A26, forma de cloruro Amberlite® IRA958. En diversas realizaciones de la invención, el ácido malónico se eluye de la resina utilizando un pH o un gradiente de sal. En realizaciones adicionales de la invención, una o más de estas resinas se utilizan para eliminar las impurezas del ácido malónico concentrado

Mientras que los procedimientos de purificación se pueden usar como procedimientos de purificación de una sola etapa para la purificación de malonato del caldo de fermentación, también se pueden utilizar dos o más procedimientos de purificación en serie. Por ejemplo, la precipitación del malonato con hidróxido de calcio puede seguirse de esterificación de Fischer del malonato con etanol y la purificación adicional del malonato de dietilo resultante usando destilación.

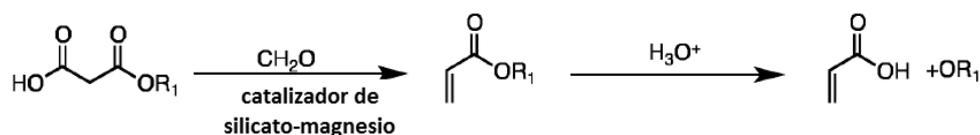
### Sección 8: Química para usar malonato para sintetizar otras sustancias químicas

El malonato es un precursor químico en una gran cantidad de reacciones industriales importantes. La presente invención permite, por primera vez, el uso de malonato derivado biológicamente en estas reacciones. En cualquier reacción conocida que utilice malonato como reactivo, se puede usar malonato derivado biológicamente. En cualquier reacción que usa un malonato de monoalquilo, malonato de dialquilo o ácido de Meldrum, el malonato derivado biológicamente se puede usar después de la conversión en el sustrato apropiado para la reacción. Por lo tanto, la invención proporciona nuevos procedimientos de síntesis química en los que se utiliza malonato como material de partida.

Por lo tanto, además de proporcionar malonato derivado biológicamente para su uso en reacciones químicas conocidas, la invención proporciona nuevos procedimientos para usar malonato y compuestos derivados de malonato para producir otros compuestos útiles.

La invención se debe en parte al hecho de que los compuestos derivados de malonato y malonato pueden usarse como sustratos en la síntesis de acrilatos (es decir, acrilato, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de propilo y acrilato de butilo) por reacción con formaldehído. Los acrilatos representan miles de millones de dólares al año en ventas y se utilizan en productos tan variados como pañales para aplicar champú a películas y recubrimientos. La invención proporciona dos síntesis básicas para la producción de un acrilato por reacción de diésteres de malonato o malonato con formaldehído. En un procedimiento, el malonato-diéster se hace reaccionar con formaldehído en presencia de una base apropiada (por ejemplo, dietilamina) para producir el diéster de 2-metilenmalonato. La posterior saponificación de los ésteres y el calentamiento dan como resultado la producción de una parte de acrilato, una parte de CO<sub>2</sub> y dos partes de alcohol. La composición de la porción de éster del diéster de malonato, la base y el disolvente utilizado pueden variar ampliamente. Por ejemplo, se pueden utilizar ésteres de dimetilo, dietilo, dipropilo dibutilo diisopropilo o dihexilo. De forma similar, la base utilizada puede ser una de muchas. En varias realizaciones, la base es una amina trisustituida. Los ejemplos de aminas trisustituidas adecuadas para su uso de acuerdo con los procedimientos de la invención incluyen aquellas seleccionadas del grupo que contiene piperidina, trimetilamina, trietilamina, tripropilamina, trisopropilamina, tributilamina, o trialquilamina de cadena más larga. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el malonato de dietilo se hace reaccionar con formaldehído en pirrolidina para formar acrilato en una condensación de Knoevenagel y posteriormente se saponifica y se calienta para producir una parte de acrilato, una parte de CO<sub>2</sub> y dos partes de etanol. En otras realizaciones del procedimiento de la invención, el malonato de dimetilo se hace reaccionar con formaldehído en dietilamina para formar 2-metilenmalonato de dimetilo que posteriormente se convierte en acrilato, CO<sub>2</sub> y metanol.

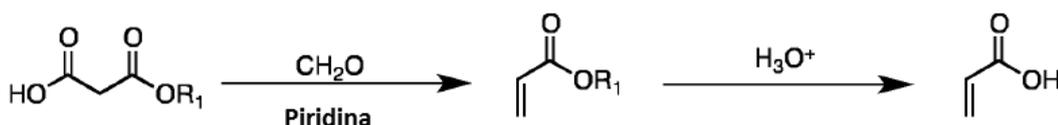
En otras realizaciones, una sal de magnesio cataliza la condensación de un diéster de malonato con formaldehído para formar un diéster de 2-metilenmalonato que luego se trata de la manera descrita. Por ejemplo, el silicato de magnesio es una sal de magnesio adecuada para esta reacción. En algunas realizaciones, el malonato de dietilo se hace reaccionar con formaldehído en presencia de un catalizador de silicato de magnesio para formar 2-metilenmalonato de dietilo. En otras realizaciones, el malonato de diisopropilo se hace reaccionar con formaldehído en presencia de un catalizador de silicato de magnesio para formar 2-metilenmalonato de diisopropilo. A continuación se ilustra un esquema general que utiliza un monoéster de malonato:



En este caso, R., se selecciona de los ejemplos no limitantes: H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, o



En otra realización, se emplea una modificación de Doebner de la condensación de Knoevenagel y el malonato se hace reaccionar con formaldehído en piridina para producir acrilato. El ejemplo 28 ilustra la producción de acrilato a partir de malonato de acuerdo con esta realización de la invención. En otras realizaciones, el malonato de monometilo se hace reaccionar con formaldehído en piridina para formar acrilato de metilo. En el esquema ilustrado en el presente documento, un mono-éster de malonato sirve como material de partida en una modificación de Doebner de la condensación de Knoevenagel



$R_1$  se selecciona de los ejemplos no limitantes: H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$ , o  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ . En otras realizaciones, el malonato de monoetilo se hace reaccionar con formaldehído en piridina para formar acrilato de etilo.

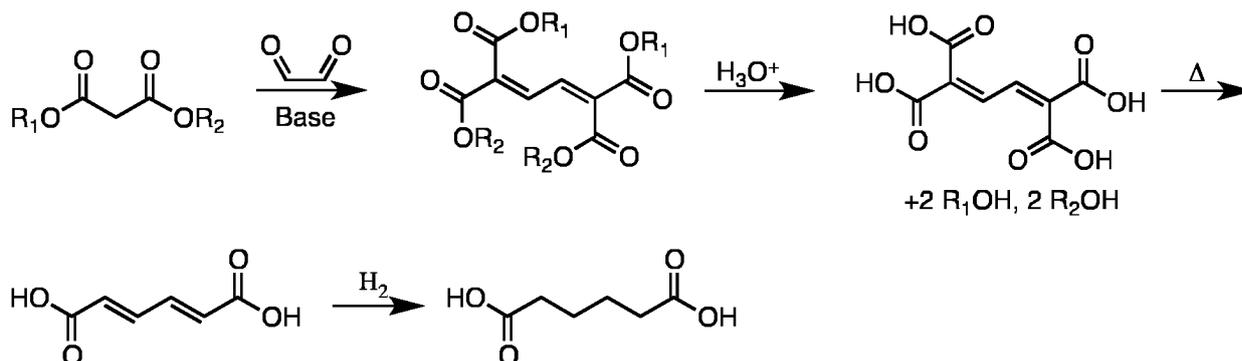
Además, se desvela el uso de malonato y los compuestos derivados de malonato se pueden usar como sustratos en la síntesis de ácidos dicarboxílicos insaturados a través de la reacción con varios sustratos, incluidos aldehídos, haluros de alquilo, dialdehídos, dihaluros de alquilo, olefinas terminales y combinaciones de los anteriores (es decir, sustratos difuncionales). En el caso de reacción de malonato o compuesto derivado de malonato con un aldehído, se forma un alqueno que puede hidrogenarse posteriormente para producir el producto saturado. De manera general, se pueden usar compuestos derivados de malonato y malonato para sintetizar la cadena lineal C5-C12, diácidos saturados o insaturados (es decir, ácido pentanodioico (CAS 110-94-1), ácido hexanodioico (CAS 124-04-9), ácido heptanodioico (CAS 111-16-0), ácido octanodioico (CAS 505-48-6), ácido nonanodioico (CAS 123-99-9), ácido decanodioico (CAS 111-20-6), ácido undecanodioico (CAS 1852-04-6), ácido dodecanodioico (CAS 693-23-2) y sus correspondientes ésteres dialquílicos. En diversas realizaciones de la invención, El malonato se utiliza como sustrato en la síntesis química de un diácido saturado de cadena lineal C5-C12. En particular, El malonato o un compuesto derivado de malonato se utiliza como sustrato en la síntesis química de ácido pentanodioico, ácido hexanodioico, ácido heptanodioico, ácido octanodioico, ácido nonanodioico, ácido decanodioico, ácido undecanodioico o ácido dodecanodioico.

Además, un compuesto derivado de malonato se puede usar como un sustrato en la síntesis química del ácido pentanodioico. El ácido pentanodioico se puede formar de acuerdo con la invención a través de la reacción del malonato de dietilo derivado de forma sintética y formaldehído (véase Ahluwalia y col., "Organic reaction mechanisms," 2ª ed. Alpha Science International: Harrow (2005) pág. 340-341); malonato de dietilo derivado de manera sintética y diclorometano (véase Perkin y col., J Am Chem Soc 59: 990-995 (1891)); y ácido de Meldrum y formaldehído derivados sintéticamente (véase el Hedge y col., J. Org. Chem. 26:3166-3170 (1961)).

Además, el malonato o un compuesto derivado de malonato se pueden usar como un sustrato en la síntesis química del ácido hexanodioico. El ácido hexano dioico es uno de los dos compuestos utilizados para producir Nylon 6,6 y representa miles de millones de dólares en ventas anuales de materias primas. Nylon 6,6 se utiliza en una amplia gama de bienes de consumo duraderos, incluidos alfombras, airbags para automóviles, y cuerdas. El ácido hexanodioico se puede formar de acuerdo con la invención a través de la reacción de monoésteres de malonato quelado con magnesio y 1,2-dicloroetano. Se ha descrito la alquilación de dicloroetano y malonato de dimetilo (Patente de Estados Unidos N.º 6.262.298); sin embargo, el producto no deseado ciclopropano-1,1-dicarboxilato de dimetilo es el único producto registrado con una pureza del 99,3 % y un rendimiento teórico del 83 %. La formación de ciclopropano-1,1-dicarboxilato resulta de la alquilación intramolecular después de la alquilación inicial de 1,2-dicloroetano. En cambio, la presente invención proporciona materiales y procedimientos para usar un monoéster de malonato quelado con magnesio que no permite la alquilación intramolecular no deseada al ciclopropano. Un monoéster de malonato quelado con magnesio reacciona con 1,2-dicloroetano a través de la generación de enolato facilitada por descarboxilación; la segunda reacción intramolecular (es decir, al dicarboxilato de ciclopropano) no puede continuar después de la descarboxilación. Un ejemplo de catalizador para su uso de acuerdo con esta realización de la invención es silicato de magnesio. Los expertos en la materia aprecian que diversos dihaloalcanos (por ejemplo, 1,3-dihaloetano, 1,2-dihaloetano) también se pueden usar con un monoéster de malonato quelado con magnesio para formar un producto de ácido dicarboxílico y que esos grupos haluro pueden ser I, Cl, Br o F. Por ejemplo, y sin limitación, un 1,3-dihaloetano se puede hacer reaccionar con un monoéster de malonato quelado con magnesio para producir ácido heptanodioico.

También se desvelan procedimientos para la producción de ácido hexanodioico por reacción de malonato y compuestos derivados de malonato con etanodial. La formación de ácidos alquenoicos por la reacción de Knoevenagel de los diésteres de malonato y los mono-aldehídos alifáticos es conocida (véase, por ejemplo, Rao y col., J Am Oil Chem Soc, 70:297-299 (1993); y, Zhang y col., Synth Comm, 40:3093-3100 (2010)). La presente invención surge en parte del descubrimiento de que un dialdehído puede reaccionar con un compuesto derivado de

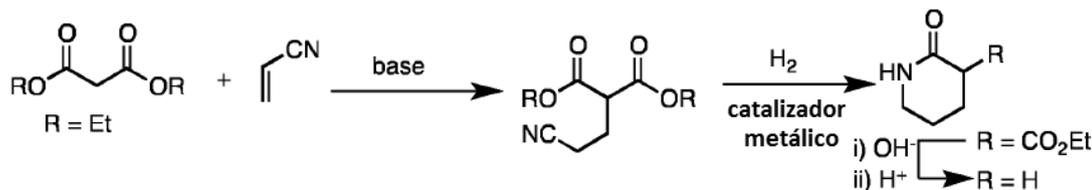
malonato para producir el tetraéster correspondiente 1,3-dieno-1,1,4,4-tetracarboxilato. Por ejemplo, la reacción del malonato de dietilo con etanodial produce buta-1,3-dieno-1,1,4,4-tetracarboxilato de tetraetilo; de forma similar, la reacción del malonato con etanodial (glioxal) produce ácido hexa-2,4-dienodioico. La hidrólisis de los grupos éster, cuando se desee, procede a través de la adición de ácido a la mezcla de reacción. La descarboxilación para formar el ácido dicarboxílico insaturado (es decir, ácido hexa-2,4-dienodioico) se induce térmicamente, y la posterior hidrogenación del ácido dicarboxílico insaturado produce ácido hexanodioico. En algunas realizaciones de la invención, el malonato de dietilo y el etanodial se condensan para producir el éster etílico de bis-malonato dialquilado; la posterior saponificación para hidrolizar los grupos éster seguidos de la descarboxilación inducida térmicamente produce el ácido dicarboxílico insaturado. La hidrogenación del ácido dicarboxílico insaturado produce ácido hexanodioico. Este procedimiento se resume en el siguiente esquema de reacción, en el que los grupos alquilo ( $R_1$  y  $R_2$ ) se eligen de los ejemplos: H,  $CH_3$ ,  $CH_3CH_2$ ,  $CH_3(CH_2)_2$ ,  $CH_3(CH_2)_3$ ,  $(CH_3)_2CH_2$ , o  $(CH_3)_2CH_2CH_2$ .



Los expertos en la materia aprecian que la condensación de Knoevenagel de diversos dialdehídos y compuestos derivados de malonato se puede usar de acuerdo con los procedimientos de la invención para sintetizar ácidos dicarboxílicos saturados e insaturados (con los alquenos en las posiciones 2 y n-2). Por ejemplo, el propanodial se puede usar para sintetizar ácido heptanodicarboxílico, se usa butano-1-4-dial para sintetizar ácido octanodicarboxílico, y se puede usar pentano-1,5-dial para sintetizar ácido nonanodicarboxílico.

Además, se puede usar un malonato o un compuesto derivado de malonato como un sustrato en la síntesis química del ácido heptanodioico. Además de las rutas dihaloalcano y dialdehído al ácido heptanodioico descrito anteriormente, también se desvelan procedimientos para la síntesis de ácido heptanodioico a través de la reacción de prop-2-enal (acroleína), que pueden o no derivarse de malonato como se proporciona en la invención, y malonato. La adición de Michael de malonato a prop-2-enal produce un ácido 2- (3-oxopropil) malónico, y la condensación posterior al resto aldehído con otra molécula de malonato produce ácido hex-1-eno-1,1,6,6-tetracarboxílico. La descarboxilación inducida térmicamente seguida de hidrogenación produce ácido heptanodioico.

Además, el malonato se puede usar como un sustrato en la síntesis química de una lactama o lactona. En una realización, la conversión sintética de malonato de dietilo en delta-valerolactama a través de las etapas siguientes; el malonato de dietilo se produce por esterificación por Fischer del malonato con etanol. La adición de Michael de malonato de dietilo a acrilonitrilo produce 2-(2-cianoetil)malonato de dietilo. La hidrogenación del resto nitrilo de 2-(2-cianoetil)malonato de dietilo produce un aminoácido que se lactamiza en condiciones suaves para producir 2-oxopiperidin-3-carboxilato de etilo. La saponificación del resto éster del 2-oxopiperidin-3-carboxilato de etilo, seguido del calentamiento da como resultado la descarboxilación para proporcionar delta-valero-lactama. Este ejemplo se ilustra en el presente documento:



Además, se puede usar malonato de mono-etilo como un sustrato en la síntesis química del acetato de etilo. El calentamiento del malonato de monoetilo da como resultado una descarboxilación inducida térmicamente para formar acetato de etilo. En particular, se puede usar malonato de monoetilo para sintetizar acetato de etilo. Un experto en la técnica reconocerá que existen varios procedimientos establecidos para preparar malonatos de monoalquilo a partir del ácido malónico proporcionado por la invención.

Además, un malonato de monoalquilo (por ejemplo, malonato de mono-metilo, malonato de mono-etilo, malonato de mono-propilo, malonato de mono-butilo, malonato de mono-isobutilo) se pueden usar como sustrato en la síntesis

química de 3-hidroxiopropionato o sus ésteres de alquilo relacionados. El borano reducirá de manera quimioselectiva el resto de ácido carboxílico libre del malonato de monoalquilo y producirá el 3-hidroxiopropionato de alquilo correspondiente. Los propios 3-hidroxiopropionatos de alquilo son productos valiosos. El éster también se puede hidrolizar para dar 3-hidroxiopropionato. El 3-hidroxiopropionato puede deshidratarse a su vez a ácido acrílico, una sustancia química valiosa se describe con más detalle en el presente documento. En particular, se usa un malonato de monoalquilo para sintetizar 3-hidroxiopropionato. En particular, el malonato de monoalquilo es malonato de monometilo o malonato de monoetilo.

Además, el malonato se puede usar para sintetizar un compuesto de 1,3-dicarbonilo dialquilado. En particular, el malonato se puede usar como un sustrato en la síntesis química de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2,2-dimetilmalonato de dietilo, 2,2-dietilmalonato de dietilo, 2,2-dipropilmalonato de dietilo, 2,2-dibutilmalonato de dietilo, 2,2-dimeilmalonato de dimetilo, 2,2-dietilmalonato de dimetilo, 2,2-dipropilmalonato de dimetilo y 2,2-dibutilmalonato de dimetilo. La síntesis de compuestos de 1,3-dicarbonilo dialquilados se puede formar de acuerdo con la invención a partir de malonatos de dialquilo derivados sintéticamente utilizando haluros de alquilo (véase Gatterman y col., "The practical methods of organic chemistry" 3ª ed., The Macmillan Company: New York, pág. 189:-191 (1916)).

En particular, el ácido malónico o el compuesto derivado de malonato se puede hacer reaccionar con urea para formar ácido barbitúrico, la estructura central de aproximadamente cincuenta productos farmacéuticos relacionados actualmente en el mercado, incluyendo fenobarbital.

En los procedimientos sintéticos anteriores, se utiliza una preparación de malonato altamente purificada para la reacción sintética y/o aplicaciones posteriores asociadas; en otras realizaciones, se utiliza un malonato menos purificado. En otros casos, se puede usar un lisado crudo u otro malonato relativamente no purificado para la reacción sintética y/o aplicaciones posteriores. Para la mayoría de las reacciones de química sintética, típicamente se desea una pureza de malonato superior al 90 % p/p. En los casos en que el malonato se usa para reacciones de polimerización, se puede desear una pureza aún mayor (es decir, 95 % p/p o superior). En otras aplicaciones, sin embargo, se puede emplear una preparación de malonato mucho menos pura. Por ejemplo, el malonato es útil como alimento animal, y para este fin, se pueden emplear las propias células productoras o un lisado crudo de ellas.

Además, el malonato (producido por cualquier medio) puede hacerse reaccionar con glutarato-semialdehído (que también se puede producir a partir de malonato) para producir ácido hept-2-enodioico. Este es un ejemplo adicional de una condensación de Knoevenagel y se puede realizar con la amplia gama de disolventes y reactivos catalíticos asociados con esta reacción. El ácido hept-2-enodioico se reduce luego utilizando hidrogenación catalítica para producir ácido heptanodioico (ácido pimélico). El ácido pimélico tiene una amplia variedad de usos, incluido como monómero en Nylon 5,7; como un suplemento de medios de fermentación utilizado para mejorar la biosíntesis de biotina; y como plastificante. Los procedimientos de la técnica anterior para la síntesis de ácido pimélico son costosos y de bajo rendimiento. Esto proporciona una nueva síntesis química para este importante compuesto que se puede derivar del ácido malónico como se proporciona en la invención.

Además, se puede usar hidrogenación en fase líquida o vapor para convertir los dialquilmalonatos en 1,3-propanodiol. Debido a la naturaleza reactiva del carbono número dos de los ésteres de malonato y malonato, los derivados polisustituídos de diversos compuestos pueden producirse usando el malonato proporcionado por la invención. En particular, se produce neopentilglicol (2,2-dimetilpropano-1,3-diol), un componente importante de algunos poliésteres, generando primero malonato de 2,2-dimetil-dialquilo. Este compuesto se puede producir utilizando una variedad de bases como catalizadores y un haluro de metilo como fuente del grupo metilo. La posterior hidrogenación de los grupos éster da como resultado la producción de neopentilglicol y los alcoholes afines de los grupos éster. Esto representa una ruta novedosa a este importante compuesto industrial. Además, debido a la naturaleza altamente reactiva del carbono número dos de malonato y compuestos derivados de malonato, se pueden emplear otros haluros de alquilo para dar como resultado nuevos compuestos con el potencial de nuevas propiedades cuando se incorporan en polímeros.

La invención, habiendo sido descrita con detalle, se ilustra con los siguientes ejemplos. Los ejemplos no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1: Construcción de ácidos nucleicos recombinantes que codifican EHD3 de tipo salvaje y los mutantes de EHD3 E124S, E124A, E124A/E308V y E124V malonil-CoA hidrolasas y vectores de expresión para la producción de malonato en *E. coli***

La presente invención proporciona procedimientos para producir malonato en un huésped de *E. coli*, así como las células huésped de *E. coli* que producen malonato y expresan una enzima mutante EHD3, incluyendo, pero sin limitaciones, E124S, E124A y E124V. Este ejemplo describe la construcción de secuencias codificantes de proteínas para EHD3 y las proteínas EHD3 mutantes útiles en la invención, vectores de expresión que contienen esas secuencias codificantes y células huésped que comprenden esos vectores de expresión. El ácido nucleico que codifica EHD3 de *S. cerevisiae* de tipo salvaje se amplificó por PCR a partir de levadura de Baker utilizando un par

de cebadores A93/A94. La mutación puntual E124A se introdujo utilizando los pares de cebadores A93/A96 y A95/A94, la mutación E124V se introdujo utilizando los pares de cebadores A93/A98 y A97/A94, y la mutación E124S se introdujo utilizando los pares de cebadores A93/A100 y A99/A94. Los ácidos nucleicos resultantes se clonaron en un vector de expresión de *E. coli* que contiene el origen de replicación pSC101, un casete de resistencia al cloranfenicol y un promotor  $P_{LacO1}$  que utiliza técnicas estándar. Los vectores resultantes se transformaron en un huésped DH10b de *E. coli* y se colocaron en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían 50 µg/ml de cloranfenicol ( $Cm^{50}$ ) y 2 % p/v de glucosa. Luego se inocularon colonias individuales en 3 ml de medio LB en placas de 48 pocillos; después de 6 horas de crecimiento, se aislaron los plásmidos y se secuenció la región de codificación de la proteína EHD3. Al secuenciar los plásmidos derivados de clones de EHD3 (E124A), se descubrió que una segunda mutación puntual, E308V, estabilizó el clon EHD3 (124A); la presencia de un resto de valina sin carga probablemente estabiliza el plegamiento de proteínas. La cepa EHD3 (E124A, E308V) también se usó para la producción de malonato (véase el Ejemplo 2). Los cebadores A93-A100 son las SEQ ID NO: 13-20, respectivamente.

### Ejemplo 2: Producción *in vivo* de malonato en *E. coli* utilizando mutantes de EHD3 E124S y E124A/E308V

Este ejemplo describe las células huésped y las condiciones de cultivo que dan como resultado la producción *in vivo* de malonato usando una malonil-CoA hidrolasa EHD3 heteróloga en una célula huésped de *E. coli*. La cepa K12 de *E. coli* se transformó con vectores que contienen EHD3 de tipo salvaje, EHD3 (E124A), EHD2 (E124V), EHD3 (E124S), EHD3 (E124A, E308V) o un control negativo de vector vacío. Los transformantes se sembraron en placas de agar LB ( $Cm^{50}$ , 2 % de glucosa). Después del crecimiento durante la noche a 37 °C, las colonias individuales se inocularon en 3 ml de LB ( $Cm^{50}$ , 2 % de glucosa) en una placa de 48 pocillos. Los cultivos se incubaron en un agitador de placas a 37 °C durante 6 horas, punto en el cual a cada cultivo se inoculó 1 % v/v en medio mínimo M9 suplementado con  $Cm^{50}$  y una fuente de carbono mixta (0,5 % de glicerol, 0,05 % de glucosa, 0,2 % de lactosa) en una placa de 48 pocillos. Los cultivos se incubaron en un agitador de placas a 30 °C y se retiró una muestra de 500 µl del caldo de fermentación para su análisis después de 48 horas de incubación.

Las muestras se centrifugaron (x 6000 g, 1 min) y se analizó el sobrenadante para determinar la cuantificación de malonato. Los patrones químicos se prepararon en 20 µM de agua. La separación de malonato se llevó a cabo en un Shimadzu Prominence XR UPLC conectado a un detector de índice de refracción y un detector de rayos UV de monitorización a 210 nm. La separación del producto se realizó en una columna de monitorización de fermentación Bio-Rad Aminex HPX-87h. La UPLC se programó para funcionar isocráticamente utilizando  $H_2SO_4$  5 mM como eluyente con un caudal de 600 µl por minuto. Se inyectaron 10 µl por muestra y la temperatura de la placa de muestras se mantuvo a 4 °C. Los patrones de malonato comenzaron a eluir en ~ 19,8 minutos. La adición del patrón a las muestras que contienen malonato demostró un aumento proporcional en el área del pico de malonato, confirmando la producción de malonato. Las concentraciones de malonato (mg/l) se calcularon por comparación con una curva estándar preparada a partir de malonato auténtico.

Para los cultivos que albergan el control de vectores vacíos, no se observó un pico al mismo tiempo de retención que el patrón de malonato, y el área del pico integrada estaba por debajo del límite de detección del instrumento (es decir, no se observó producción de malonato). La producción de malonato se observó en muestras que albergan EHD3 de tipo salvaje, EHD3 (E124A), EHD3 (E124V), EHD3 (E124S) y EHD3 (E124A, E308V); las concentraciones de malonato fueron (media ± desviación estándar; n=3): EHD3 de tipo salvaje,  $6,0 \pm 0,2$  mg/l, EHD3 (E124A),  $7,6 \pm 0,7$  mg/l, EHD3 (E124V),  $0,28 \pm 0,03$  mg/l, EHD3 (E124S),  $82,3 \pm 7,8$  mg/l y EHD3 (E124A/E308V),  $8,35 \pm 2,5$  mg/l. EHD3 (E124V) produjo una disminución en la producción de malonato en relación con la proteína de tipo salvaje, probablemente debido a la mala unión del sustrato malonil-CoA y la alta actividad promiscua hacia otras moléculas endógenas de acil-CoA. De forma similar, EHD3 (E124A) produjo solo un aumento menor en la producción de malonato en relación con EHD3 de tipo salvaje. La EHD3 mutante E124S dio lugar a un significativo (p < 0,05, prueba t) aumento de la producción de malonato sobre EHD3 de tipo salvaje, EHD3 (E124A) y EHD (E124V), demostrando la importancia de E124S en el aumento de la unión de sustratos de malonil-CoA y la producción de malonato.

### Ejemplo 3: Construcción de los mutantes de EHD3 E124 adicionales y vectores de expresión para la producción *in vivo* de malonato en *E. coli*

El ejemplo 1 describe la construcción de vectores de expresión de *E. coli* para EHD3 de tipo salvaje y un subconjunto de mutaciones E124, específicamente E124A, E124V, E124S y E124A/E308V, y el Ejemplo 2 describe su uso para producir malonato en células de *E. coli*. Este ejemplo describe la construcción de vectores de expresión de *E. coli* para todas las mutaciones puntuales de EHD3 E124, es decir, E124G, E124T, E124C, E124L, E124I, E124M, E124P, E124Y, E124W, E124D, E124N, E124Q, E124H, E124K, E124R y E124F. Estos mutantes de EHD3 se construyeron utilizando un vector de *E. coli* con origen pSC101 y origen de replicación  $P_{LacO1}$ , tal como se describe en el Ejemplo 1. El cebador directo de PCR comprende la secuencia de ácido nucleico (5'-aatctttactactatatNNNtatcttgaattttcaaatagc-3'), en el que la secuencia "NNN" son los tres nucleótidos que codifican la mutación puntual del aminoácido E124 deseado; asimismo, el cebador inverso de PCR comprende la secuencia de ácido nucleico (5'-ttcaaagaataaNNNat-cagtaaaaaatttgatggacttg-3'), en la que la secuencia "NNN" es complementaria a los tres nucleótidos que codifican la mutación puntual del aminoácido E124 deseado. El cebador directo de PCR se usó junto con el cebador de PCR A94 (SEQ ID NO: 14), y el cebador inverso de PCR se usó junto

con el cebador de PCR A93 (SEQ ID NO: 13) para producir dos fragmentos solapantes del gen de EHD3 que contienen la mutación puntual deseada. La amplificación de los dos fragmentos del gen EHD3 con los cebadores A93 y A94 produjo el gen EHD3 de longitud completa que contenía la mutación puntual deseada. Los vectores de expresión se construyeron utilizando protocolos de clonación estándar y se transformaron en DH10b de *E. coli* y posteriormente se aislaron como se describe en el Ejemplo 1 y se verificaron mediante secuenciación.

#### **Ejemplo 4: Producción *in vivo* de malonato en *E. coli* recombinante utilizando los mutantes de EHD3 E124**

Este ejemplo describe la fermentación de un conjunto de células huésped de *E. coli*, cada miembro del conjunto contiene una de las 19 posibles sustituciones de aminoácidos EHD3 E124 y la determinación de los niveles de malonato producidos. Las mutaciones puntuales específicas E124 deberían mejorar teóricamente la unión de malonil-CoA y la producción de malonato en relación con el tipo salvaje; en particular, las mutaciones puntuales E124T, E124N, E124Q, E124H, E124K y E124R deberían mejorar la producción de malonato, en teoría, debido a la introducción de aminoácidos que contienen grupos funcionales que mejoran la interacción con el resto ácido carboxílico terminal del malonato. Las mutaciones puntuales E124S, E124Q y E124K tienen cadenas laterales que se ubican en el bolsillo de unión de EHD3 en las posiciones que teóricamente deberían coordinar mejor la unión del malonato. La producción de malonato se realiza y cuantifica sustancialmente como se describe en el Ejemplo 2.

#### **Ejemplo 5: Construcción de vectores de expresión de YciA malonil-CoA hidrolasa para la producción *in vivo* de malonato en *E. coli***

Este ejemplo describe el uso de YciA de *E. coli* para la producción de malonato en *E. coli* de acuerdo con la invención. La acil-CoA YciA de *E. coli* de tipo salvaje se amplifica por PCR a partir del genoma del huésped utilizando los cebadores A120 (SEQ ID NO: 21) y A121 (SEQ ID NO: 22). El ácido nucleico resultante se clona detrás del promotor P<sub>LacO1</sub> en un plásmido de expresión de *E. coli* que contiene un origen de replicación pSC101 y un gen resistente a la ampicilina. El vector de control comprende un vector vacío sin la inserción del gen *yciA* detrás del promotor P<sub>LacO1</sub>. Como se describe en el Ejemplo 1, Se cultivan colonias individuales, se aisló su plásmido y se secuenció la región codificante del inserto del gen YciA.

#### **Ejemplo 6: Producción *in vivo* de malonato en *E. coli* recombinante utilizando YciA heteróloga**

Este ejemplo describe las células huésped y las condiciones de cultivo que dan como resultado la producción *in vivo* de malonato usando un vector de expresión que codifica una malonil-CoA hidrolasa heteróloga de YciA como se describe en el Ejemplo 5 en una célula huésped de *E. coli*. La cepa K12 de *E. coli* de tipo salvaje se transforma con vectores que contienen YciA de *E. coli*; *E. coli* de tipo salvaje que alberga un vector vacío sirve como control negativo. La producción de malonato se realiza y cuantifica como se describe en el Ejemplo 2.

#### **Ejemplo 7: Construcción de vectores de expresión de malonil-CoA hidrolasa EHD3 diseñados para la producción *in vivo* de malonato en levadura**

La presente invención también proporciona vectores de expresión, células huésped y procedimientos para la producción *in vivo* de malonato en una célula de levadura. Las células de levadura pueden, en general, tolerar concentraciones más altas de ácidos orgánicos en el caldo de fermentación y poseen protocolos de fermentación industrial mejor establecidos que *E. coli*.

Los vectores de expresión de levadura descritos en este ejemplo se generaron en parte a partir del uso de los vectores de expresión de *E. coli* descritos en los Ejemplos 1 y 3 como moldes de PCR para los genes de EHD3. Los vectores de expresión de levaduras contienen un origen de replicación de 2 micrómetros, un marcador *ura3* auxotrófico y un promotor de TEF; los vectores también contienen un origen de replicación *puc* y un casete de resistencia a la ampicilina o al cloranfenicol para la propagación del vector en *E. coli*. Los plásmidos se transformaron en un fondo BY4741 o BY4742 de *S. cerevisiae*, ambos derivados de la cepa parental S288C.

Se pueden introducir mutaciones adicionales en la secuencia de codificación de EHD3 para anular el direccionamiento mitocondrial. Los aminoácidos básicos R3, K7, K14, K18 y R22 en la secuencia de codificación de EHD3 son importantes para el direccionamiento mitocondrial, y la mutación de uno o más de ellos a A o V disminuye la expresión de EHD3 mitocondrial y aumenta la expresión de EHD3 citosólica. Las mutaciones se introducen mediante amplificación por PCR de un molde de EHD3 con cebadores directos e inversos que contienen la mutación puntual deseada. Las mutaciones se introducen utilizando cebadores que coinciden con el gen de EHD3, con la excepción de que la secuencia de nucleótidos en la posición del aminoácido deseado se altera mutando "gyt" (donde y es un nucleótido de cisteína o timina en una población mixta de oligonucleótidos cebadores de PCR). Los fragmentos génicos se clonan primero en un vector de expresión de *E. coli* que aloja un origen de replicación pSC101, un promotor P<sub>LacO1</sub> y el marcador de resistencia al cloranfenicol, y las secuencias del vector confirmadas como se describe en el Ejemplo 1; después del aislamiento del mutante deseado, el gen EHD3 se amplifica y clona en un vector de expresión de levadura.

**Ejemplo 8: Producción *in vivo* de malonato en levadura recombinante utilizando malonil-CoA hidrolasa de EHD3 diseñada por ingeniería**

Las células huésped BY4742 de *S. cerevisiae* se transforman con un vector de expresión de levadura preparado sustancialmente como se describe en el Ejemplo 7 que alberga EHD3 heteróloga o un plásmido de control negativo de vector vacío utilizando protocolos estándar. Los transformantes se siembran por rayado en placas de agar con medio de deserción completo sintético (SD) que carecen de uracilo y se cultivan a 30 °C; las colonias individuales se cultivan durante la noche en 3 ml de medio SD durante la noche a 30 °C y posteriormente se diluyen al 1 % v/v en 3 ml de SD sin uracilo. Las cepas se cultivan a 30 °C durante 72 horas; se tomaron alícuotas de 500 µl a los puntos de tiempo de 24, 48 y 72 horas para la cuantificación de la producción de malonato y DO<sub>600</sub>. El promotor TEF es un promotor constitutivo.

**Ejemplo 9: Aumento de la biosíntesis de malonato en levaduras modificadas mediante ingeniería genética mediante la expresión de acetil-CoA sintetasa heteróloga**

Además de los procedimientos, vectores y células huésped para la expresión de una malonil-CoA hidrolasa heteróloga y producción *in vivo* de malonato, como se ilustra en los ejemplos 1-8, la invención también proporciona procedimientos y células huésped para mejorar el título, el rendimiento, y/o la productividad del malonato. En un aspecto, la producción de malonato se mejora al aumentar la biosíntesis de acetil-CoA. Este ejemplo describe la expresión heteróloga de enzimas acetil-CoA sintetasa en un huésped recombinante de *S. cerevisiae* que comprende una ruta de malonil-CoA hidrolasa y la mejora resultante en la producción de malonato. Las cinco proteínas acetil-CoA sintetasa ilustradas son ACS1 y ACS2 de *S. cerevisiae*, AcsA de *E. coli*, Acs de *Salmonella enterica* y AcsA de *Bacillus subtilis*. Todos los genes se amplifican por PCR a partir de sus respectivos huéspedes y se clonan en un vector de expresión de levadura que alberga un origen de replicación de 2 micrómetros, un marcador *ura3* auxotrófico y un promotor de TEF; los vectores también contienen un origen de replicación *puc* y un casete de resistencia a la ampicilina para la propagación del vector en *E. coli*.

**Ejemplo 10: Aumento de la biosíntesis de malonato en levaduras modificadas por ingeniería genética mediante la expresión de piruvato deshidrogenasa heteróloga**

Mientras que el Ejemplo 9 describe el aumento de la biosíntesis de acetil-CoA a través de la expresión de acetil-CoA sintetasas heterólogas, este ejemplo describe el aumento de la biosíntesis de acetil-CoA a través de la expresión de enzimas piruvato deshidrogenasa heterólogas. En concreto, las enzimas piruvato deshidrogenasa de *S. cerevisiae* PDA1, PDB1, LAT1, LPD1 y PDX1 se expresan de manera heteróloga en *S. cerevisiae* recombinantes que comprenden una vía de malonil-CoA hidrolasa. Todos los genes se amplifican por PCR a partir del cromosoma de *S. cerevisiae* y se clonan en un vector de expresión de levadura que alberga un origen de replicación de 2 micrómetros, un marcador *ura3* auxotrófico y un promotor de TEF; los vectores también contienen un origen de replicación *puc* y un casete de resistencia a la ampicilina para la propagación del vector en *E. coli*.

**Ejemplo 11: Aumento de la biosíntesis de malonato en *E. coli* y *S. cerevisiae* por expresión heteróloga de una vía catabólica de etanol**

Este ejemplo describe una tercera vía para aumentar la biosíntesis de acetil-CoA: expresión heteróloga de una vía catabólica de etanol. Una vía catabólica de etanol comprende dos o tres enzimas. Una alcohol deshidrogenasa y una acetaldehído deshidrogenasa (acilante) o una alcohol deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa (no acilante) y una acetil-CoA sintetasa. Las enzimas alcohol deshidrogenasa de ADH2 de *S. cerevisiae*, AdhP de *E. coli* y ADH1A de *H. sapiens*, ADH1B de *H. sapiens* y ADH1C de *H. sapiens* se clonan combinatoriamente con una acetaldehído deshidrogenasa (acilante) o aldehído deshidrogenasa y acetil-CoA sintetasa. Las enzimas de la acetaldehído deshidrogenasa (acilante) MhpF de *E. coli*, AdhE de *E. coli*, DmpF de *Pseudomonas sp CF600* y TodI de *Pseudomonas putida* también se clonan de forma combinatoria. En las vías catabólicas de etanol que utilizan una acetaldehído deshidrogenasa (no acilante) se usan ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, y ALD6 de *S. cerevisiae*. Las enzimas acetil-CoA sintetasa utilizadas son ACS1 y ACS2 de *S. cerevisiae* y Acs de *E. coli*. Todos los genes son amplificados por PCR a partir de ADN genómico.

Para las células huésped de *E. coli*, la ruta catabólica del etanol se expresa a partir de un esqueleto del vector que alberga el origen de replicación *p15a*, un marcador de resistencia a la ampicilina y un promotor *P<sub>lacO1</sub>*. Todas las combinaciones de las dos y tres vías genéticas se construyen como operones individuales. K12 de *E. coli* se cotransforma con un plásmido de expresión de EHD3 y un plásmido catabólico de etanol y se siembra por rayado en placas de agar LB (Cm<sub>51</sub>, Cb<sup>50</sup>, 2 % en p/v de glucosa). Las cepas de control albergan vectores vacíos. Los cultivos de producción y su análisis se llevan a cabo como se describe en el Ejemplo 2, con la notable excepción de la adición del segundo antibiótico, se requiere mantener el segundo plásmido.

Las fermentaciones de *S. cerevisiae* pueden llevarse a cabo utilizando concentraciones de etanol idénticas a las de los experimentos de *E. coli*. Los vectores de expresión de levadura albergan un origen de 2 micrómetros, un marcador auxotrófico *ura3* y un promotor CUP, y todas las combinaciones de las rutas catabólicas del etanol se construyen en este esqueleto del vector; un plásmido sin una vía catabólica de etanol sirve como control negativo. Un plásmido de la ruta catabólica de etanol se transforma en BY4742 de *S. cerevisiae* recombinante que comprende

una vía de malonil-CoA hidrolasa de EDH3 diseñada por ingeniería en un cromosoma de levadura. Todas las fermentaciones se realizan a 30 °C en medios SD sin uracilo. La expresión de la ruta catabólica del etanol se induce con sulfato de cobre 100 µM después de 12 o 24 horas de crecimiento. Se tomaron muestras de alícuotas de 500 µl a las 24, 48 y 72 horas para la cuantificación de las concentraciones de etanol, acetaldehído, acetato y malonato; las mediciones de la DO<sub>600</sub> de densidad celular también se registran en cada punto de tiempo. Además del título de malonato, se calcula el consumo de etanol.

#### **Ejemplo 12: Aumento de la biosíntesis de malonato en *S. cerevisiae* por expresión heteróloga de una ATP citrato liasa**

Este ejemplo describe un cuarto enfoque para aumentar la biosíntesis de acetil-CoA y mejorar la producción de malonato en *S. cerevisiae* recombinante. La ATP citrato liasa (EC 2.3.3.8) cataliza la formación de acetil-CoA, oxaloacetato y ADP en el citosol a partir de citrato. Las enzimas de ATP citrato liasa de las levaduras oleaginosas *Candida curvata*, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofer*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutanis*, *Trichosporon cutaneum*, *Yarrowia lipolytica*, se amplifican por PCR a partir de ADN genómico y se clonan en un vector de expresión de levadura detrás de un promotor CUP; el vector de expresión contiene un origen de 2 micrómetros y un marcador auxotrófico leu2d. Un plásmido que carece de la enzima ATP citrato liasa sirve como control negativo.

Un plásmido de la ruta de la ATP citrato liasa se transforma en BY4742 de *S. cerevisiae* recombinante que comprende una ruta de malonil-CoA hidrolasa de EHD3 diseñada por ingeniería en un cromosoma de levadura. Todos los experimentos se realizan a 30 °C en medios SD sin uracilo. La expresión de la vía de la ATP citrato liasa se induce con sulfato de cobre 100 µM después de 12 o 24 horas de crecimiento. Algunos cultivos también se complementan con citrato de 0,5, 1, 2,5 o 5 g/l para proporcionar una demostración adicional de la actividad de la vía. Se tomaron muestras de alícuotas de 500 µl a las 24, 48 y 72 horas para la cuantificación de las concentraciones de citrato (cuando corresponda) y malonato; las mediciones de la DO<sub>600</sub> de densidad celular también se registran en cada punto de tiempo. Además del título de malonato, se puede calcular el consumo de citrato.

#### **Ejemplo 13: Incremento de la biosíntesis de malonato en levaduras recombinantes mediante la modificación del almacenamiento de ácidos grasos de la célula huésped**

Este ejemplo describe un quinto enfoque para aumentar la biosíntesis de acetil-CoA y mejorar la producción de malonato en *S. cerevisiae* recombinante. Las vías de biosíntesis de ácidos grasos compiten con la producción de malonato para acetil-CoA y malonil-CoA, y la alteración del anabolismo de los ácidos grasos de la célula huésped puede aumentar la producción de malonato. La presente invención proporciona células huésped que comprenden modificaciones genéticas de uno o más ácidos nucleicos que codifican proteínas que afectan el almacenamiento y catabolismo de los ácidos grasos. En *Saccharomyces cerevisiae*, las proteínas SNF2, IRA2, PRE9, PHO90, SPT21, POX1, ANT1, FOX3, EHD3, PAS1, PAS3, ARE1, ARE2, DGA1, LRO1, ACL1, MAE1, GLC3, GLG1, GLG2, PAT1 y PEX11 se eliminan de forma individual y combinatoria y las cepas resultantes se cultivan para la producción de malonato. Todas las cepas de *S. cerevisiae* construidas comprenden una vía de malonil-CoA hidrolasa de EHD3 diseñada por ingeniería para la producción de malonato. Las fermentaciones se realizan como se describe en el Ejemplo 8 y el malonato se cuantifica como se describe en el Ejemplo 2.

#### **Ejemplo 14: Aumento de la biosíntesis de malonato en levaduras recombinantes a través de una mayor actividad de beta-oxidasa**

Este ejemplo describe un sexto enfoque para aumentar la biosíntesis de acetil-CoA y mejorar la producción de malonato en *S. cerevisiae* recombinante. Además de disminuir el anabolismo de los ácidos grasos de la célula huésped, el aumento del catabolismo de los ácidos grasos de la célula huésped puede aumentar la producción de malonato. La presente invención proporciona células huésped modificadas para aumentar la expresión de PAT1 y/o PEX11. PAT1 y PEX11 se amplifican por PCR a partir del ADN genómico de *S. cerevisiae* y se clonan en un vector de expresión de levadura detrás de un promotor CUP; el vector de expresión contiene un origen de 2 micrómetros y un marcador auxotrófico leu2d. Un plásmido sin una enzima beta-peroxidasa sirve como control negativo.

Un plásmido de la vía de la beta-oxidasa se transforma en BY4742 de *S. cerevisiae* recombinante que comprende una vía de malonil-CoA hidrolasa de EHD3 diseñada por ingeniería en un cromosoma de levadura. La malonil-CoA hidrolasa diseñada por ingeniería se integra en el cromosoma mediante procedimientos de recombinación estándar. La cepa resultante sirve como base para probar modificaciones posteriores y su impacto en la producción de malonato. Todos los experimentos se realizan a 30 °C en medios SD sin uracilo. La expresión de la vía se induce con sulfato de cobre 100 µM después de 12 o 24 horas de crecimiento. Algunos cultivos también se complementan con 0,5, 1, 2,5 o 5 g/l de ácido palmítico para proporcionar una demostración adicional de la actividad de la vía. Se tomaron muestras de alícuotas de 500 µl a las 24, 48 y 72 horas para la cuantificación de las concentraciones de ácido palmítico (cuando corresponda) y de malonato; las mediciones de la DO<sub>600</sub> de densidad celular también se registran en cada punto de tiempo. Además del título de malonato, se puede calcular el consumo de ácido palmítico.

**Ejemplo 15: Mejora de la biosíntesis de malonato en levaduras diseñadas por ingeniería mediante el aumento de la actividad de la acetil-CoA carboxilasa**

Además de los procedimientos, vectores y células huésped para la expresión de una malonil-CoA hidrolasa heteróloga y producción *in vivo* de malonato, la invención también proporciona procedimientos y células huésped para mejorar el título, el rendimiento, y/o la productividad del malonato. En un aspecto, la producción de malonato se mejora al aumentar la biosíntesis de malonil-CoA. El malonil-CoA es el penúltimo intermedio en la biosíntesis de malonato a partir de acetil-CoA, y en *S. cerevisiae*, esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC1).

La biosíntesis de malonil-CoA se incrementa por la sobreexpresión de ACC1 de *S. cerevisiae*. Con este fin, el gen ACC1 se clona utilizando procedimientos estándar detrás del promotor CUP en un plásmido de expresión de *S. cerevisiae* que contiene un origen de replicación de 2 micrómetros y un marcador auxotrófico *ura3*. El vector de control comprende un vector vacío. Las cepas huésped de *S. cerevisiae* están diseñadas por ingeniería con deleciones cromosómicas de la proteína quinasa ACC1 y SNF1 responsables de la fosforregulación de ACC1; las deleciones cromosómicas se construyen de forma independiente y en combinación. Las células huésped que albergan plásmidos de expresión o plásmidos de control se cultivan como se describe en el Ejemplo 8 y la producción de malonato se cuantifica como se describe en el Ejemplo 2.

**Ejemplo 16: Mejora de la biosíntesis de malonato en células huésped mediante la suplementación del caldo de fermentación con cerulenina**

En este ejemplo, la producción de malonato en una célula huésped recombinante que expresa una malonil-CoA hidrolasa derivada de EHD3 se mejora mediante la suplementación del caldo de fermentación con cerulenina. El plásmido de producción de malonato A4, que comprende EHD3 de *S. cerevisiae* (E124S) bajo el control de un promotor P<sub>LacO1</sub>, se transforma en un huésped de *E. coli* K12.

Las colonias individuales se inoculan en 3 ml de medio LB (Cm<sub>50</sub>, 2 % EN p/v de glucosa) en placas de 48 pocillos y se cultivan durante 6 horas a 37 °C en un agitador de placas. Las cepas se subcultivan después al 1 % en v/v en 3 ml de medio mínimo M9 (Cm<sub>50</sub>, 0,5 % en p/v de glicerol, 0,05 % en p/v de glucosa, 0,2 % en p/v de lactosa) y se cultivaron a 30 °C en un agitador de placas. Tras 6 horas de crecimiento, la mitad de los cultivos se suplementan con 10 mg/l de cerulenina. Después de 48 horas de crecimiento, la concentración de malonato en el sobrenadante se mide como se describe en el Ejemplo 2.

**Ejemplo 17: Mejora de la biosíntesis de malonato en levadura diseñado por ingeniería mediante la suplementación del caldo de fermentación con dióxido de carbono**

En este ejemplo, las condiciones de fermentación se modifican para aumentar la biosíntesis de malonil-CoA. La conversión enzimática de acetil-CoA en malonil-CoA por la enzima acetil-CoA carboxilasa requiere una cantidad estequiométrica de dióxido de carbono y la suplementación de los medios de crecimiento con dióxido de carbono aumenta la producción de malonato. El dióxido de carbono se añade al medio de crecimiento como carbonato de calcio sólido o dióxido de carbono gaseoso.

Las células de levadura recombinante que albergan una vía biosintética de malonil-CoA se cultivan en un medio mínimo definido suplementado con entre 0,1 y 10 g/l de carbonato de calcio. Los cultivos de control no están suplementados con carbono calcio. La producción de malonato se cuantifica como se describe en el Ejemplo 2 en el transcurso de un crecimiento de 48 horas.

**Ejemplo 18: Mejora de la biosíntesis de malonato en levaduras diseñadas por ingeniería mediante la reducción del catabolismo de malonato**

En este ejemplo, la producción de malonato aumenta al eliminar el catabolismo endógeno de malonato en la célula huésped. *S. cerevisiae* contiene múltiples acil-CoA sintetasas, incluyendo FAA1, FAA2, FAA3, FAA4, LSC1 y LSC2; por delección o modificación de los ácidos nucleicos en el genoma del huésped que codifica estas proteínas, se puede disminuir el catabolismo del malonato en los medios de crecimiento.

Las cepas defectivas en malonil-CoA se construyen a partir de cada una de las acil-CoA sintetasas de levadura. Las cepas resultantes se cultivan luego en un medio definido suplementado con 1-5 g/l de malonato de sodio. La concentración de malonato en el caldo de fermentación se controla a lo largo de 48 horas y se cuantifica como se describe en el Ejemplo 2. Las cepas con múltiples deficiencias pueden construirse siguiendo procedimientos similares.

**Ejemplo 19: Mejora de la biosíntesis de malonato en levaduras diseñada por ingeniería mediante una mejor secreción de malonato de la célula huésped**

En este ejemplo, la producción de malonato se mejora al aumentar la secreción de malonato de la célula huésped. Esto se logra mediante la sobreexpresión de una o más de cada una de las bombas resistentes a *S. cerevisiae* pleiotrópica, a saber, PDR5, PDR10, PDR11, PDR12, PDR15 y PDR18.

**Ejemplo 20: Mejora de la biosíntesis de malonato en levaduras diseñadas por ingeniería mediante la reducción de la inhibición competitiva de la succinato deshidrogenasa por malonato**

En este ejemplo, la inhibición competitiva de succinato deshidrogenasa de *S. cerevisiae* SDH1 disminuye, lo que permite obtener títulos más altos de malonato. En primer lugar, La *S. cerevisiae* está genéticamente modificada para la delección de la copia cromosómica nativa de la succinato deshidrogenasa (SDH1) utilizando procedimientos estándar. La cepa resultante se cultiva anaeróbicamente para facilitar el crecimiento en ausencia de la proteína SDH1. La cepa de delección de *SDH1* se transforma posteriormente con un vector que alberga un casete de expresión de SDH modificado genéticamente que contiene una mutación E300D, R331K, R331H, R442K, R442H o una combinación de estas mutaciones. Estos genes de SDH mutantes se clonan detrás de un promotor TEF constitutivo en un esqueleto de levadura que alberga un origen de 2 micrómetros y un marcador auxotrófico *ura3*. Los vectores se transforman posteriormente en la cepa de *S. cerevisiae* que codifica la malonil-CoA hidrolasa en el cromosoma y las cepas resultantes se cultivan en medios SD que carecen de uracilo. Las cepas transformadas se cultivan para la producción de malonato como se describe en el Ejemplo 8 y el malonato se cuantifica como se describe en el Ejemplo 2 para cuantificar el impacto de estas mutaciones de SDH en la producción de malonato.

**Ejemplo 21: Biosensor del factor de transcripción de malonato MdcY utilizando malonato añadido exógenamente.**

El plásmido S14 se usó para demostrar la respuesta del biosensor al malonato añadido exógenamente en una célula huésped de *E. coli*. S14 emplea el factor de transcripción sensible al malonato, MdcY (SEQ ID NO: 3) y el promotor sensible a MdcY,  $P_{MdcY}$  (SEQ ID NO: 6) derivado de *Acinetobacter calcoaceticus*. Este biosensor de la invención se construyó utilizando un esqueleto de vector de *E. coli* con marcador de resistencia a la ampicilina y origen de replicación de ColE1; el gen de resistencia a la tetraciclina *tetA* se colocó bajo el control del promotor  $P_{MdcY}$ . La transformación del plásmido S14 en un huésped de *E. coli* dio como resultado una cepa que expresa el producto del gen *tetA* después de la suplementación del caldo de fermentación con malonato, y la cepa exhibe un aumento dependiente de malonato en la resistencia a la tetraciclina.

Los ácidos nucleicos que codifican para los productos génicos MdcY y TetA, el promotor  $P_{MdcY}$  y el esqueleto del vector de *E. coli* se produjeron sintéticamente; los vectores biosensores se construyeron mediante la amplificación por PCR de los ácidos nucleicos y su posterior clonación en el esqueleto del vector de *E. coli*. Los plásmidos se transformaron en *E. coli* DH10b químicamente competente y los clones resultantes se sembraron en placas de agar LB que contenían 50 µg/ml de carbenicilina ( $Cb^{50}$ ). Las colonias individuales se cultivaron durante la noche en 3 ml de medio LB suplementado con antibiótico y se verificaron las secuencias del plásmido purificado.

La cepa K12 de *E. coli* se cotransformó con plásmidos S14 y las colonias individuales aisladas de placas de agar LB ( $Cb^{50}$ ). Las colonias se cultivaron en 25 ml de caldo LB ( $Cb^{50}$ ) hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de aproximadamente 0,50, punto de tiempo en el cual se prepararon las reservas de células y se almacenaron a -80 °C; las reservas celulares fueron 0,5 ml de cultivo celular y 0,5 ml de una solución de glicerol al 50 % en v/v.

Todas las demostraciones de biosensores se realizaron con malonato. Se descongeló una parte alícuota de la reserva de células biosensoras y se utilizó para inocular 50 ml de medio LB ( $Cb^{50}$ ) en un matraz Erlenmeyer con deflector de 250 ml. Los cultivos se incubaron durante 2 horas a 37 °C; posteriormente, se añadieron 0,6 ml de cultivo biosensor a las placas de 48 pocillos preparadas con 2,3 ml de medio LB ( $Cb^{50}$ ) suplementado con tetraciclina y ácido malonato a la concentración deseada ( $n = 4$ ). Las placas se cultivaron luego a 30 °C en un agitador de placas de valoración orbital. Después de 12 horas de incubación, se tomaron muestras de 200 µl para la medición de  $DO_{600}$ .

Los cultivos biosensores que albergan S14 mostraron una respuesta dependiente de la dosis para el malonato (Figura 1). El intervalo dinámico (la diferencia máxima en los valores de  $DO_{600}$  entre las muestras totalmente inducidas y las muestras que carecen de suplementación de malonato) fue de 1,2 unidades de  $DO_{600}$ , lo que indica que el biosensor basado en  $MdcY-P_{MdcY}$  era altamente sensible al malonato añadido exógenamente. Se observó un aumento de la  $DO_{600}$  entre 0,5-1 mM de malonato añadido exógenamente, proporcionando un intervalo adecuado sobre el cual se puede cuantificar el malonato usando este procedimiento.

**Ejemplo 22. Biosensor del factor de transcripción del malonato MdcY para detectar el malonato producido biológicamente en el caldo de fermentación**

En este ejemplo, se usó un biosensor de factor de transcripción de malonato para detectar la producción de malonato a partir de una cepa de levadura diseñada como se describe en otros aspectos de la invención.

El ácido malónico se produjo utilizando una cepa de levadura diseñada genéticamente de la siguiente manera. Células de levadura BY4741 de *S. cerevisiae* que albergan un vector para la expresión de malonil-CoA hidrolasa que comprende un terminador de CYC1, un casete de resistencia a la ampicilina, un origen de replicación PMB1, se utilizó un origen de replicación CEN/ARS y un marcador de selección URA3 para la fermentación. La malonil-CoA hidrolasa FOPNG8-1 (de la cepa YBT-020 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*; UniProt ID FOPNG8, con la mutación E91S) y la malonil-CoA hidrolasa F6AA82-2 (de la cepa 12- X de *Pseudomonas fulva*); UniProt ID F6AA82, con mutaciones E95S y Q348A) se expresaron cada uno a partir de este plásmido bajo el control del promotor TEF1.

El medio de cultivo descrito en el Ejemplo 30 se usó con 20 g/l de glucosa como fuente de carbono. La producción se realizó de la siguiente manera. Dos ml de medio de cultivo en una placa de 48 pocillos se inocularon con 20  $\mu$ l de un cultivo iniciador de la cepa productora, por cuadruplicado. La placa se cubrió con una membrana transpirable, se incubaron en un agitador de placas a 30 °C y se tomaron muestras para HPLC y análisis biosensor del producto acumulado después de 142 horas de crecimiento. Las células y los restos celulares se eliminaron de los medios de cultivo mediante centrifugación y se filtraron a través de una membrana de 0,45 micrómetros antes del análisis por HPLC o biosensor.

Las células de *E. coli* que albergan el plásmido pS14, que codifica un gen de resistencia a la tetraciclina (tetA) bajo el control de la expresión del promotor  $P_{\text{mdcL}}$  sensible al ácido malónico, o plásmido pS27, que codifica un gen lacZ bajo control de expresión del promotor  $P_{\text{mdcL}}$  sensible al ácido malónico, se utilizaron como cepas indicadoras de biosensores. El vector pS27 se construyó de la misma manera que se describe para pS14 en el Ejemplo 21, con el gen lacZ, que codifica una beta-galactosidasa, insertada en lugar del gen tetA. Las cepas biosensoras se prepararon como se describe en el Ejemplo 21.

Los medios sin levadura obtenidos de las placas de producción de 96 pocillos se añadieron a placas de 96 pocillos que contenían 120  $\mu$ l de cultivo celular biosensor. Para el biosensor TetA (pS14), se añadieron 10  $\mu$ l de solución madre de tetraciclina (para proporcionar un intervalo de 20-35  $\mu$ g/ml) a cada pocillo. Para el biosensor TetA (pS14) y lacZ (pS27), el volumen restante de cada pocillo se llenó con medio LB ( $\text{Cb}^{50}$ ) hasta un volumen final de 600  $\mu$ l y se cultivó como se ha descrito anteriormente. Las muestras (200  $\mu$ l) se recogieron en placas de 96 pocillos después de 2 h para los cultivos S27 y después de 5-8 h para los cultivos S14, y se midió la  $\text{DO}_{600}$ . Se realizó un ensayo de orto-nitrofenil- $\beta$ -galactósido (ONPG) en muestras de placas biosensoras S27 (indicador de beta-galactosidasa) de la siguiente manera. Las células se diluyeron a 1:4 en 25  $\mu$ l de tampón de lisis y, posteriormente, se añadieron a cada pocillo 90  $\mu$ l de solución madre de ONPG (10 mg/ml en agua desionizada). Los contenidos de cada pozo se mezclaron completamente y se dejaron a 30 °C durante 4-16 horas. Las densidades ópticas se midieron a 420 nm.

Se observó una respuesta dependiente de la dosis al malonato. Las concentraciones específicas de ácido malónico también se midieron por HPLC, como se describe en el Ejemplo 2, y se ha cuantificado en comparación con una curva patrón. Análisis de regresión lineal entre la salida cuantificable del biosensor, se calculó que la  $\text{DO}_{420}$  (para pS27) o la  $\text{DO}_{600}$  (para pS14) y las concentraciones específicas de ácido malónico medidas por HPLC tenían coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de 0,88492 que representaban 37 muestras de  $\text{DO}_{420}$  y de 0,89755 que representaban 18 muestras de  $\text{DO}_{600}$ .

Un experto en la materia reconocerá que estos coeficientes de determinación muy altos son indicativos de la correlación entre la salida del biosensor y la concentración de malonato en los medios de cultivo. Este aspecto de la invención proporciona una ventaja tremenda tanto en coste como en tiempo con respecto al cribado de resultados diferenciales en la producción de malonato biológico. La dilución de los medios de cultivo utilizados para desafiar el biosensor puede facilitar la extensión del intervalo de respuesta dinámica del sensor desde cero a la saturación completa de la solución de malonato. El uso de un tamiz basada en placa permite el análisis de 96 muestras en unos pocos minutos en comparación con un requisito de tiempo de 2 a 20 minutos o más por muestra para el análisis de HPLC. Los ahorros en la inversión de capital y el uso y la eliminación de solventes generados por la limitación o el reemplazo de la HPLC también son sustanciales.

### **Ejemplo 23. Precipitación de malonato del caldo de fermentación mediante la adición de hidróxido de calcio, carbonato de calcio y cloruro de calcio**

En este ejemplo, el ácido malónico se purificó del caldo de fermentación por precipitación con un catión divalente, específicamente calcio. Los procedimientos de purificación se demostraron utilizando metabolitos sintéticos añadidos exógenamente al caldo de fermentación. Se cultivó un cultivo de levadura de *S. cerevisiae* BY4741 en 0,5 l de medio completo sintético durante 72 h a 30 °C, 200 rpm. Después de 72 h, se usaron partes alícuotas de 25 ml de caldo de fermentación de células completas para disolver 0, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 g/l de equivalentes de ácido malónico. Cada muestra de 25 ml se dividió en cinco alícuotas de 5 ml, y el pH de una alícuota de cada concentración se ajustó a 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 o 7,5. Todas las muestras se centrifugaron ( $\times 6000$  rcf, 5 min, 25 °C) y los sobrenadantes se transfirieron a un tubo separado. El análisis por HPLC mostró ácido malónico solo en la fracción sobrenadante. A continuación, cloruro de calcio, un catión divalente representativo, se empleó para precipitar ácido malónico de la fracción de sobrenadante clarificada por adición en equivalentes equimolares a 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 g/l de ácido malónico de cada muestra a 25 °C. La concentración de malonato restante en el sobrenadante y el precipitado se midió luego por HPLC como se describe en el Ejemplo 2. A concentraciones inferiores a 5 g/l, la eficiencia de extracción fue del 10 % o menos. También fue insignificante una vez que el pH se redujo a 5,5. Sin embargo, a concentraciones más altas y valores de pH de 6-7,5, este procedimiento fue bastante eficaz para purificar malonato. Las respectivas eficiencias de extracción (porcentaje aislado del caldo de fermentación) para este procedimiento a 100 g/l, 75 g/l, 50 g/l, 25 g/l, y 10 g/l son los siguientes: pH 7,5 = 89,8 %, 88,5 %, 83,3 %, 70,1 % y 66,4 %; pH 7,0 = 88,0 %, 86,9 %, 81,8 %, 71,5 % y 63,9 %; pH 6,5 = 80,5 %, 79,0 %, 75,8 %, 65,0 % y 59,0 %; pH 6,0 = 54,4 %, 55,0 %, 52,8 %, 43,0 %, 34,9 %.

Estos resultados demuestran que este procedimiento de la invención purificó el ácido malónico del caldo de fermentación, separándolo de las células de levadura y otras sustancias químicas disueltas.

**Ejemplo 24: Purificación del malonato derivado biológicamente del caldo de fermentación mediante extracción reactiva con etanol y metanol**

En este ejemplo, el malonato producido de forma endógena a partir de cultivos de *S. cerevisiae* que albergan una vía de biosíntesis de malonato se purifica a partir de caldo de fermentación mediante extracción reactiva. Las células huésped se eliminan primero de 50 ml de caldo de fermentación mediante centrifugación (x6000 rcf, 5 min). La formación del éster dietílico y dimetílico en el caldo de fermentación se realiza mediante procedimientos adaptados de: Gatterman L. y Babsinian VS. "The practical methods of organic chemistry" 3<sup>a</sup> ed, The Macmillan Company: New York, pág. 161-162 (1916). En resumen, se añade cloruro de sodio al caldo de fermentación; posteriormente, se añaden etanol y ácido sulfúrico que conducen a la formación del éster de malonato de dietilo.

**10 Ejemplo 25: Extracción reactiva de malonato del caldo de fermentación utilizando aminas terciarias**

El caldo de fermentación de levadura se prepara como se describe en el Ejemplo 23. El ácido malónico se agrega exógenamente al caldo de fermentación hasta una concentración final de 50 g/l. El pH de la solución se ajusta a un valor <4,0 mediante la adición de un ácido.

15 Se preparan tres soluciones de aminas terciarias (TA) utilizando 1-octanol como diluyente a 0,25, 0,5 y 0,75 mol-TA/kg de 1-octanol. Las aminas terciarias utilizadas son trietilamina, tripropilamina, tributilamina, tripentilamina, trihexilamina, triheptilamina, trionilamina y tridecilamina.

20 Un volumen igual de disolvente orgánico que contiene la amina y el diluyente se mezclan con un caldo de fermentación que contiene malonato. La reacción se agita a 1000 rpm, 25 °C, durante 2 horas; posteriormente, las dos fases se separan por centrifugación (x6000 rcf, 10 min). La concentración de malonato en cada fase se puede medir por HPLC como se describe en el Ejemplo 2.

**Ejemplo 26: Destilación reactiva de malonato del caldo de fermentación usando metanol y etanol**

25 Este ejemplo describe la destilación reactiva de malonato del caldo de fermentación usando metanol y etanol; una resina de intercambio catiónico, Amberlyst-15, se utiliza como catalizador sólido. La resina se seca en un horno de vacío durante 6 horas a 70 grados C antes de su uso. El conjunto consiste en una columna de vidrio empaquetada con cerámica adherida a un contenedor de recolección. La esterificación se lleva a cabo en un reactor conectado al fondo de la columna. Se coloca un condensador en la parte superior de la columna para la condensación de vapores volátiles bajos. El reactor de esterificación se alimenta con el caldo de fermentación y la resina de intercambio iónico, Amberlyst-15 (2% p/p), se añade como un catalizador. Se aplica suficiente calor al reactor para vaporizar la mezcla de reacción y se añade metanol o etanol al reactor una vez que se alcanza la temperatura deseada. Las muestras se extraen de las válvulas de drenaje del reactor de esterificación y el recipiente de recolección. Después de completarse la reacción, se miden los volúmenes y las masas de las mezclas de reacción finales del reactor de esterificación y los recipientes de recolección. El consumo de malonato y la formación del producto se miden como se describe en el Ejemplo 2.

**Ejemplo 27: Conversión sintética de malonato en malonato de dimetilo y malonato de dietilo**

35 El malonato derivado biológicamente se produce a partir de *S. cerevisiae* recombinante en matraces de cultivo de 1 l de la siguiente manera: las cepas se siembran por rayado en placas de agar con medio de desecación completa sintética (SD) sin uracilo y se cultivan a 30 °C; las colonias individuales se cultivan durante la noche en 3 ml de medio SD durante la noche a 30 °C y posteriormente se diluyen al 1 % v/v en 500 ml de SD sin uracilo. Las cepas se cultivan a 30 °C durante 72 horas. El caldo de fermentación resultante se centrifuga (x 6000 g, 10 min) y el sobrenadante se separa del sedimento celular. El malonato se precipita del caldo de fermentación utilizando cloruro de calcio (consulte el Ejemplo 23). El malonato de calcio resultante se convierte luego en malonato de dietilo añadiendo un exceso de etanol y ácido sulfúrico equimolar para catalizar una esterificación de Fischer.

**Ejemplo 28: Producción de acrilato a partir de malonato y formaldehído mediante modificación de Doebner de la condensación de Knoevenagel**

45 El acrilato se produjo de acuerdo con la invención a través de la condensación de ácido malónico con paraformaldehído en piridina. La reacción se llevó a cabo en un matraz de fondo redondo de 3 bocas con un agitador magnético. Se añadieron quince ml de piridina y 15 ml de tolueno al matraz, y se añadieron 10 g de ácido malónico en polvo en 5 partes iguales; posteriormente, se añadieron 1,1 equivalentes (3,2 g) de paraformaldehído al recipiente de reacción durante un período de treinta minutos. La mezcla se agitó vigorosamente para promover la solubilización de los componentes. La temperatura de la reacción se inició a 0 ° C y luego se incrementó en el transcurso de varias horas a 50 ° C hasta la formación de dióxido de carbono, evidenciado por la formación de burbujas, fue observado. Después de 2 horas de calentamiento a 50 ° C, se dejó que el matraz volviera a la temperatura ambiente y una parte alícuota de la reacción se diluyó 100 veces en agua y se analizó por HPLC usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. La muestra de ácido acílico derivado de malonato coeluyó con un estándar auténtico en un tiempo de elución de aproximadamente 17,5 minutos (véase la Figura 2).

55 Mientras que la modificación de Doebner de la reacción de Knoevenagel se ha utilizado para producir muchos

compuestos, Su uso en la producción de acrilatos es novedoso e importante. Más de mil millones de kilogramos de ácido acrílico se utilizan anualmente para fabricar una amplia gama de productos, desde pañales hasta películas y recubrimientos. Actualmente se obtiene en gran parte del petróleo y la producción utilizando el procedimiento descrito en la presente invención proporciona una ruta parcial u opcionalmente totalmente renovable a este producto químico, Dependiendo de la fuente de paraformaldehído. Además, El ácido malónico producido a través de los procedimientos de la presente invención será sustancialmente menos costoso que su homólogo derivado del petróleo. Esto facilita la producción de ácido acrílico sostenible o parcialmente sostenible a un costo competitivo con la ruta petroquímica tradicional.

#### **Ejemplo 29: Producción de ácido pentanodioico a partir de malonato y formaldehído**

El malonato derivado biológicamente se produce a partir de *S. cerevisiae* recombinantes en matraces de cultivo L como se describe en el Ejemplo 8. El caldo de fermentación resultante se centrifuga (x 6000 g, 10 min) y el sobrenadante se separa del sedimento celular. El malonato se precipita del caldo de fermentación usando cloruro de calcio y se convierte en malonato de dietilo. A continuación, el malonato de dietilo derivado biológicamente se hace reaccionar con formaldehído en piridina y se procesa hasta el ácido deseado de acuerdo con los procedimientos de la literatura (Hedge y col., (1961) JOC 26: 3166-3170).

#### **Ejemplo 30: Producción biocatalítica de malonato a partir de diversas fuentes de carbono.**

De acuerdo con la invención, las células de levadura BY4741 de *S. cerevisiae* que albergan un vector de expresión de malonil-CoA hidrolasa que comprende un terminador CYC1, un gen de resistencia a la ampicilina, un origen de replicación PMB1, un origen de replicación CEN/ARS y un marcador de selección URA3 se cultivaron en medios de fermentación de levadura que comprenden 5 g/l de sulfato de amonio, 1 g/l de fosfato monopotásico, 0,5 g/l de sulfato de magnesio, 0,1 g/l de cloruro de sodio, 0,1 g/l de cloruro de calcio, 2 mg/l de inositol, 0,5 mg/l de ácido bórico, 0,4 mg/l de pentotenato de calcio, 0,4 mg/l de niacina, 0,4 mg/l de clorhidrato de piridoxina, 0,4 mg/l de tiamina HCl, 0,4 mg/l de sulfato de cinc, 0,4 mg/l de sulfato de manganeso, 0,2 mg/l de ácido p-aminobenzoico, 0,2 mg/l de riboflavina, 0,2 mg/l de molibdato de sodio, 0,2 mg/l de cloruro férrico, 0,1 mg/l de yoduro de potasio, 40 µg/l de sulfato de cobre, 2 µg/l de ácido fólico, 2 µg/l de biotina, 10 mg/l de adenina, 50 mg/l de L-arginina HCl, 80 mg/l de ácido L-aspártico, 20 mg/l de L-histidina HCl, 50 mg/l de L-isoleucina, 100 mg/l de L-leucina, 50 mg/l de L-lisina HCl, 20 mg/l de metionina, 50 mg/l de L-fenilalanina, 100 mg/l de L- treonina, 50 mg/l de L-triptófano, 50 mg/l de L-tirosina y 140 mg/l de L-valina (los medios de base). En diferentes fermentaciones, cada uno de los siguientes se utilizó como única fuente de carbono: 20 g/l de glucosa, 2 % en v/v de etanol o 2 % en v/v de glicerol.

En este ejemplo, la malonil-CoA hidrolasa FOPNG8-1 (de *Bacillus thuringiensis subsp. finitimus*, cepa YBT-020; UniProt ID FOPNG8, con la mutación E91S) se usó bajo el control del promotor TEF. Un ml y medio de medio de base suplementado con 2 % de la fuente de carbono en una placa de 48 pocillos se inoculó con 50 µl de un cultivo saturado de la cepa productora para el cultivo por triplicado. La placa de cultivo se cubrió con una membrana transpirable, se incubó en un agitador de placas a 30 °C y se tomaron muestras para el análisis de HPLC de la acumulación del producto después de 138 h de crecimiento.

El análisis de HPLC de la acumulación de malonato se realizó como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados fueron los siguientes: glucosa como fuente de carbono: malonato 4,8 mM +/- 0,2 mM (desviación estándar); etanol como fuente de carbono: malonato 7,5 mM +/- 0,8 mM; y glicerol como fuente de carbono: malonato 1,7 mM +/- 0,1 mM. Estos resultados muestran que las fuentes de carbono analizadas fueron todas adecuadas para su uso en la producción de malonato de acuerdo con la invención.

#### **Ejemplo 31: Construcción y expresión de vectores plasmídicos recombinantes que codifican diversas malonil-CoA hidrolasas y su uso en la producción de malonato en levaduras**

Los ácidos nucleicos que codifican diversas malonil-CoA hidrolasas proporcionados por la invención se amplificaron por PCR a partir de plásmidos utilizando los cebadores que se enumeran a continuación: cebadores de EHD3 (E124S) Y1-11\_A13-R (SEQ ID NO:23)/ Y1-11\_A13-F (SEQ ID NO:24); cebadores B9IZZ9-1 YO012 (SEQ ID NO:25)/YO013 (SEQ ID NO:26); cebadores FOPNG8-1 YO014 (SEQ ID NO:27)/YO015 (SEQ ID NO:28); cebadores C3AL13-1 YO018 (SEQ ID NO:29)/YO019 (SEQ ID NO:30); cebadores Q81DR3-1 YO020 (SEQ ID NO:31)/YO021 (SEQ ID NO:32); cebadores A4XS22-1 YO024 (SEQ ID NO:33)/YO025 (SEQ ID NO:34); cebadores E2XN63-1 YO026 (SEQ ID NO:35)/YO027 (SEQ ID NO:36); cebadores A5W8H3-1 YO028 (SEQ ID NO:37)/YO029 (SEQ ID NO:38); y cebadores F6AA82-1 YO030 (SEQ ID NO:39)/YO031 (SEQ ID NO:40). Los productos de PCR purificados se clonaron aguas abajo del promotor TEF1 y aguas arriba del terminador CYC1 en un vector lanzadera que contiene un casete de resistencia a la ampicilina, un origen de replicación PMB1, un origen de replicación CEN/ARS y un marcador de selección URA3. Los plásmidos resultantes se transformaron en células huésped competentes de *E. coli* y se seleccionaron en placas de agar LB que contenían Cb<sup>50</sup>. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, Las colonias individuales se inocularon en 2 ml de LB-Cb<sup>50</sup> en una placa de 48 pocillos y se cultivaron durante 5 horas a 37 °C en un agitador antes de aislar los plásmidos y confirmarlos mediante secuenciación. Al secuenciar la construcción que contiene la proteína F6AA82 (E95S), se descubrió una mutación puntual no deseada, Q348A; esta mutación se atribuyó a un error durante la amplificación por PCR. La proteína resultante, F6AA82 (E95S/Q348A), también se conoce como F6AA82-2 en el presente documento. La mutación puntual Q348A no se mostró necesaria

para obtener la actividad de la proteína.

Se usaron células BY4741 de *S. cerevisiae* como huésped para los vectores para la expresión de las diversas malonil-CoA hidrolasas. Los vectores plasmídicos se introdujeron individualmente en las células huésped de levadura utilizando procedimientos estándar. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar del medio descrito en el Ejemplo 30, que contenía 2 % de glucosa como fuente de carbono.

Las ocho cepas de *S. cerevisiae* que expresan hidrolasa se cultivaron como se describe en el Ejemplo 22 y se analizaron por HPLC como se describe en el Ejemplo 2. Las concentraciones relativas de malonato en los medios de fermentación fueron las siguientes (expresadas como el área integrada bajo el pico de malonato; media  $\pm$  S.D.; n=4): BY4741 de *S. cerevisiae* (control negativo) 48,865  $\pm$  9,345; EHD3 (E124S) 94,721  $\pm$  8,115; B9IZZ9 (E91S) 261,717  $\pm$  38,012; F0PNG8 (E91S) 216,654  $\pm$  31,145; F6AA82 (E95S/Q348A) 212,096  $\pm$  29,338; E2XN63 (E95S) 198,046  $\pm$  35,084; Q81DR3 (E91S) 193,665  $\pm$  37,898; Q63BK8 (E91S) 167,477  $\pm$  8,110; y A5W8H3 (E95S) 52,047  $\pm$  9,042. Los identificadores son el ID de Uniprot(<http://www.uniprot.org/>) seguido de la mutación proporcionada por la invención para dar como resultado la producción de malonato. No se detectó malonato en muestras que consistían en un medio no inoculado con células de levadura.

En ejemplos adicionales, C3ALI3 de *Bacillus mycoides* y A4XS22 de *Pseudomonas medocina* (cepa ymp) que contiene las mutaciones E101S y E95S, respectivamente, se utilizaron como malonil-CoA hidrolasas. Debido a que las condiciones de los medios se variaron ligeramente mediante un tampón a pH 4,0, se incluyeron F0PNG8-1 y F6AA82-1 para comparación; todas otras condiciones de fermentación, muestreo, y análisis fueron como se ha descrito anteriormente. Los resultados fueron los siguientes: C3ALI3 (E101S) 10  $\pm$  1 mM, A4XS22 (E95S) 7  $\pm$  1 mM, F0PNG8 (E91S) 11  $\pm$  2 mM y F6AA82 (E95S/Q348A) malonato 23  $\pm$  2 mM. En ausencia de una proteína malonil-CoA hidrolasa, las células de *S. cerevisiae* no produjeron concentraciones detectables de malonato.

Este ejemplo demuestra, de acuerdo con la invención, que el malonato se puede producir en una célula huésped de levadura que expresa una enzima que contiene una mutación X<sub>1</sub> que confiere actividad malonil-CoA hidrolasa. Las mutaciones del sitio activo E a S comunes a todas las hidrolasas mutantes utilizadas en este ejemplo pueden utilizarse en otros miembros de estas clases de enzimas para proporcionar resultados similares.

### **Ejemplo 32: Precipitación de ácido malónico de las células y caldo de fermentación utilizando un catión monovalente**

En este ejemplo, el ácido malónico se purificó del caldo de fermentación por precipitación con un catión monovalente. El catión monovalente era sodio. Los procedimientos de purificación se demostraron utilizando ácido malónico sintético añadido exógenamente al caldo de fermentación. Se cultivó un cultivo de *S. cerevisiae* BY4741, se preparó y se sembró con ácidos malónicos como se describe en el ejemplo 23. A continuación, cloruro sódico, un catión monovalente representativo, se empleó para precipitar ácido malónico de la fracción sobrenadante clarificada. Se añadieron 2 o 4 equivalentes molares (en comparación con la concentración de malonato) de cloruro de sodio a la fracción sobrenadante de cada muestra a 25 °C. La concentración de malonato restante en el sobrenadante y el precipitado se midió luego por HPLC como se describe en el Ejemplo 2. La concentración de malonato restante en los medios sembrados con 100 g/l de malonato y tratados dos equivalentes molares de cloruro de sodio varió según el pH de la siguiente manera: pH 5,5 = 103 %, pH 6,0 = 96 %, pH 6,5 = 71 %, pH 7,0 = 74 %, pH 7,5 = 86 %. La concentración de malonato restante en el medio sembrado con 100 g/l de malonato y tratados cuatro equivalentes molares de cloruro de sodio varió según el pH de la siguiente manera: pH 5,5 = 92 %, pH 6,0 = 86 %, pH 6,5 = 66 %, pH 7,0 = 81 %, pH 7,5 = 86 %.

### **Ejemplo 33: Purificación de malonato de células y caldo de fermentación con dietilamina**

En este ejemplo, el ácido malónico se purificó a partir del caldo de fermentación mediante la adición de dietilamina. El procedimiento de purificación se demostró utilizando ácido malónico obtenido comercialmente, añadido exógenamente al caldo de fermentación. Se prepararon medios de fermentación de levadura y se añadieron cantidades conocidas de ácido malónico como se ha descrito en un ejemplo anterior. Se usó dietilamina, una amina disustituida representativa para purificar ácido malónico de la fracción de sobrenadante clarificada. Se añadieron entre 0,5 y 100 g/l de dietilamina a la fracción sobrenadante de cada muestra a 25 °C. La concentración de metabolito que permanece en el sobrenadante y el precipitado se midió como se describió previamente a través de HPLC, tal como se describe en el Ejemplo 2. La concentración de malonato restante en el medio sembrado con 100 g/l de malonato tratado con 4 equivalentes de dietilamina por equivalente de malonato varió según el pH de la siguiente manera: pH 5,5 = 100 %, pH 6,0 = 86 %, pH 6,5 = 65 %, pH 7,0 = 67 %, pH 7,5 = 57 %.

### **Ejemplo 34: Síntesis de ácido pimélico**

Este ejemplo describe la síntesis de ácido pimélico a través de la condensación de semialdehído glutarato con malonato e hidrogenación catalítica. En un matraz de fondo redondo de 250 ml se disuelven 10 gramos de semialdehído glutarato en 40 ml de piridina. Se añaden nueve gramos de ácido malónico y la mezcla se calienta, con agitación a 80 °C durante 5 horas. La piridina se elimina mediante evaporación rotatoria y el material resultante, que contiene el ácido hept-2-en-1-7-dioico intermedio, se redisuelve en hexanol. Se añade un catalizador de Pd/C y la mezcla resultante se agita bajo una atmósfera de hidrógeno durante 24 horas. El catalizador se elimina por filtración

a través de Celite; el disolvente se elimina a presión reducida; y el ácido pimélico resultante se purifica mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice.

5 El ácido pimélico es un componente clave de Nylon 5,7, que se utiliza en la fermentación para complementar la auxotrofia de biotina, así como en la producción de varios plásticos. Los procedimientos de la técnica anterior para la síntesis de ácido pimélico son costosos y de bajo rendimiento. La invención proporciona una nueva síntesis química para este importante compuesto que se puede derivar del ácido malónico que proporciona la invención.

### **Ejemplo 35: Construcción y expresión de vectores recombinantes que codifican malonil-CoA hidrolasas adicionales y producción de malonato en levadura**

10 En este ejemplo, la malonil-CoA de *E. coli*: FabD ACP transacilasa (SEQ ID NO: 53) se mutó para contener uno o más de los siguientes cambios de aminoácidos en las posiciones indicadas S92C, H201N, R117D, R117E, R117N, R117Y, R117G, R117H, Q11D, Q11E, Q11N, Q11Y, Q11G, Q11H, L93A, L93V, L93I, L93F, L93S, L93G y se usó como malonil-CoA hidrolasa en *S. cerevisiae*. El ácido nucleico que codifica FabD de *E. coli* se amplificó por PCR a partir de la cepa K12 de *E. coli* utilizando el cebador F1 (5'-ATGACGCAATTTGCATTTGTGTTCCC -3 ') y F2 (5'-TTAAAGCTCGAGCGCCGCT-3'). El gen amplificado se mutó después utilizando procedimientos estándar y se insertó en un plásmido de expresión lanzadera bajo el control del promotor TEF1 y aguas arriba del terminador CYC1. Este vector contiene un casete de resistencia a la ampicilina, un origen de replicación PMB1, un origen de replicación CEN/ARS y un marcador de selección URA3. Las combinaciones mutacionales individuales analizadas se enumeran con los resultados a continuación.

20 Las colonias individuales se inocularon en 1 ml de los medios descritos en el Ejemplo 30 que contenían un 2 % de glucosa como fuente de carbono. Los cultivos se incubaron en un agitador a 30 °C durante 24 h y se utilizaron 20 µl de estos cultivos para inocular cultivos de producción de 2 ml del mismo medio. Los cultivos de producción se cubrieron con una membrana transpirable, se incubaron con agitación a 30 °C y se tomaron muestras para el análisis de HPLC de la acumulación del producto después de 96 h y 168 h de crecimiento.

25 No se detectó malonato en muestras que consistían en un medio no inoculado con células de levadura. La levadura de tipo salvaje produjo menos de 0,1 mM de malonato después de 168 h de fermentación. La expresión de cualquiera de las cuatro variantes de FabD produjo malonato a niveles más altos que las células que no expresan estas proteínas. La acumulación de malonato después de 96 y 168 h de fermentación utilizando diversas enzimas FabD malonil-CoA-ACP transaciladas diseñadas por ingeniería expresadas en *S. cerevisiae* fue la siguiente: FabD S92C/L93V/R117H 96h = 1,01 mM, 168 h = 2,49 mM; FabD L93I/R117Y 96 h = 1,47 mM, 168 h = 2,48 mM; FabD L93S/R117G 96 h = 1,11 mM, 168 h = 2,89 mM; FabD L93I/R117Y 96 h = 1,64 mM, 168 h = 3,47 mM.

### **Ejemplo 36: Extracción reactiva de ácido malónico del agua con trialquilaminas en 1-octanol.**

35 En este ejemplo, se purificó ácido malónico a partir de agua mediante extracción reactiva con tres trialquilaminas; tripropilamina, trihexilamina y trioctilamina. El procedimiento de purificación se demostró usando ácido malónico auténtico añadido a agua destilada. Se añadió ácido malónico al agua hasta una concentración final de 100 g/l; El pH de la solución fue de aproximadamente 1,5.

40 Se mezclaron 250 µl de la solución acuosa de ácido malónico con 250 µl de una fase orgánica que consistía en 25 % en v/v de trialquilamina y 75 % en v/v de 1-octanol. Se preparó una muestra sin adición de la fase orgánica; esta muestra proporcionó una medida de la concentración inicial de ácido malónico en cada muestra. Las muestras se mezclaron por inversión durante 18 horas, se centrifugaron (x 18.000 g) durante 1 minuto y se tomaron muestras de la fase acuosa para el análisis de la concentración de ácido malónico mediante HPLC.

45 Para el análisis HPLC de ácido malónico en la fase acuosa se usó un sistema Shimadzu XR HPLC equipado con un detector UV. Se inyectaron 5 µl de cada muestra en el sistema y se separaron con una columna de control de fermentación Aminex HPX-87h (Bio-Rad, Hercules, CA). La fase móvil fue agua desionizada (pH 1,95 con ácido sulfúrico), el caudal fue de 0,6 ml/min, la temperatura del horno era de 50 °C y el detector de rayos UV monitorizó a 210 nm. Las muestras que contenían se monitorizaron para determinar la elución del ácido malónico a ~ 10 minutos después de la inyección.

50 Se extrajo 33 ± 2,6 % del ácido malónico con tripropilamina, Se extrajo 73 ± 4,4 % del ácido malónico se extrajo con trihexilamina y 89 ± 11,9 % del ácido malónico se extrajo con trioctilamina (n = 3). Por lo tanto, se prefieren las trialquilaminas de longitud de cadena larga sobre las trialquilaminas de longitud de cadena corta para aumentar la eficiencia de extracción. De las trialquilaminas utilizadas en este ejemplo, se prefiere trioctilamina a la trihexilamina de longitud de cadena más corta y tripropilamina.

### **Ejemplo 37: Disminución del pH de la fase acuosa para aumentar la extracción reactiva del ácido malónico utilizando trialquilaminas.**

55 En este ejemplo, se purificó ácido malónico a partir de agua a diferentes valores de pH por extracción reactiva con trioctilamina en 1-octanol. Primero se preparó una solución madre de 100 g/l de ácido malónico en agua. La solución madre se separó luego en muestras de trabajo que se ajustaron al pH deseado. Debido a la adición de la base

diluida, la concentración de ácido malónico a cada valor de pH se tomó tanto la concentración de ácido malónico antes como después de la extracción reactiva. El cálculo de la diferencia en la concentración de malonato entre las muestras pre y postextracción proporcionó el porcentaje de rendimiento en cada valor de pH probado.

5 La extracción reactiva se realizó de la siguiente manera. Se mezclaron 250 µl de la solución acuosa de ácido malónico con 250 µl de una fase orgánica que consistía en 25 % en v/v de trioctilamina y 75 % en v/v 1-octanol. Todas las muestras se mezclaron por inversión durante 18 horas, se centrifugaron (x18,000 g) durante 1 minuto, y se tomaron muestras de la fase acuosa para el análisis de la concentración de ácido malónico por HPLC como se describe en el Ejemplo 36.

10 Las eficiencias de extracción a cada pH fueron las siguientes; pH 1,5, 70 %; pH 2,26, 57 %; pH 2,93, 45 %; pH 4,05, 30 %; pH 4,62, 23 %; pH 5,0, 15 %; pH 5,5, 5 %; pH 6,0, 0 %; y pH 7,0, 3 %.

La eficiencia de extracción disminuyó al aumentar el pH, y la mayor eficiencia de extracción se logró a un pH de 1,5. Por encima de pH 6,0, las eficiencias de extracción fueron despreciables. Por lo tanto, se prefiere que el pH del caldo de fermentación sea inferior a 2,0 cuando se extrae ácido malónico utilizando una trialquilamina.

15 **Ejemplo 38: Aumento de la concentración de trialquilamina en una fase orgánica para aumentar la extracción reactiva de ácido malónico de una solución acuosa.**

En este ejemplo, el ácido malónico se purificó a partir de agua utilizando una fase orgánica de trialquilamina/1-octanol que contiene diferentes concentraciones de trioctilamina. El procedimiento de purificación se demostró utilizando ácido malónico sintético añadido a agua destilada hasta una concentración final de 100 g/l; El pH de la solución fue de aproximadamente 1,5.

20 Se mezclaron 250 µl de la solución acuosa de ácido malónico con 250 µl de una fase orgánica que consiste en la cantidad indicada de trialquilamina (expresada como la fracción molar con respecto al ácido malónico en la fase acuosa) en 1-octanol. Se preparó una muestra sin adición de la fase orgánica y se usó para proporcionar la medición de la concentración inicial de ácido malónico en la fase acuosa.

25 Las muestras se mezclaron por inversión durante 18 horas, se centrifugaron (x18,000 g) durante 1 minuto, y se tomaron muestras de la fase acuosa para el análisis de la concentración de ácido malónico por HPLC como se describe en el Ejemplo 36.

30 Se observó una relación lineal entre la eficiencia de extracción y la fracción mol de trioctilamina: malonato; específicamente, la relación lineal existente entre las fracciones molares de trioctilamina: ácido malónico de 0 a 1. Por encima de una relación molar de 1, el 100% del ácido malónico se extrajo en la fase orgánica. Por lo tanto, la cantidad de trialquilamina en la fase orgánica debe ser equimolar a la cantidad de ácido malónico en la fase acuosa (por ejemplo, caldo de fermentación) para maximizar el rendimiento de extracción. Idealmente, se añadirá una cantidad mayor que la cantidad equimolar de trialquilamina a la fase orgánica para compensar la disminución de las eficiencias de extracción debido a otros ácidos orgánicos y aniones en el caldo de fermentación.

35 **Ejemplo 39: Aumento del rendimiento de extracción reactiva de ácido malónico a partir de soluciones acuosas a diferentes concentraciones iónicas mediante el uso de cantidades equimolares de trioctilamina en 1-octanol.**

En este ejemplo, se purificó ácido malónico a partir de agua a diferentes concentraciones iónicas mediante extracción reactiva con trioctilamina; al aumentar la relación molar de trioctilamina en la fase orgánica a ácido malónico en la fase acuosa a 1:1, se pudo mejorar la eficiencia de extracción del ácido malónico.

40 Se añadió ácido malónico al agua hasta una concentración final de 100 g/l. La fuerza iónica se ajustó a la concentración indicada mediante la adición de cloruro de sodio. El pH final de todas las muestras después de la adición de ácido malónico y cloruro de sodio fue aproximadamente pH 1,5.

45 Se mezclaron 250 µl de la solución acuosa de ácido malónico con 250 µl de una fase orgánica que consiste en trioctilamina en 1-octanol. Los volúmenes de trioctilamina se calcularon de modo que la relación molar de trioctilamina:ácido malónico fuera la indicada; el resto del volumen fue 1-octanol. Se preparó una muestra sin adición de la fase orgánica; esta muestra proporcionó una medida de la concentración inicial de ácido malónico. Las muestras se mezclaron por inversión durante 18 horas a 18 °C, se centrifugaron (x 18.000 g) durante 1 minuto, y se tomaron muestras de la fase acuosa para el análisis de la concentración de ácido malónico por HPLC como se describe en el Ejemplo 36.

50 La fuerza iónica (concentración mM) afectó la extracción de ácido malónico utilizando 0,59, 1,07, 1,61 y 2,14 equivalentes molares de trioctilamina de la siguiente manera; a una fuerza iónica de 0, 63,5 %, 98,6 %, 99,5 % y 99,4 % de ácido malónico se recuperaron respectivamente, a una fuerza iónica de 75, 60,3 %, 91,3 %, 93,7 % y 93,6 % de ácido malónico se recuperaron respectivamente; a una fuerza iónica de 150, 55,9 %, 85,8 %, 89,5 % y 89,1 % de ácido malónico se recuperaron respectivamente; a una fuerza iónica de 225, 52,4 %, 83,5 %, 86,0 % y 85,9 % de ácido malónico se recuperaron respectivamente; a una fuerza iónica de 300, 46,5 %, 79,4 %, 83,1 % y

55

82,6 % de ácido malónico se recuperaron respectivamente; a una fuerza iónica de 375, 44,3 %, 76,7 %, 79,9 % y 80,1 % de ácido malónico se recuperaron respectivamente; a una fuerza iónica de 450, 43,3 %, 72,8 %, 77,0 % y 78,1 % de ácido malónico se recuperaron respectivamente; a una fuerza iónica de 500, 43,1 %, 72,2 %, 75,1 % y 76,6 % de ácido malónico se recuperaron respectivamente.

- 5 El aumento de la relación molar de trioctilamina: ácido malónico a 1:1 aumentó la eficacia de extracción del ácido malónico de la solución acuosa a todas las concentraciones iónicas analizadas. No se obtuvieron mejoras significativas en la eficiencia de la extracción del ácido malónico aumentando la relación molar de trioctilamina: ácido malónico por encima de 1:1. Cuando se extrae ácido malónico de soluciones acuosas, es preferente utilizar una proporción molar de trioctilamina: ácido malónico de al menos 1:1, y si no hay otros ácidos orgánicos, se prefiere una relación molar de exactamente 1:1. Si hay ácidos orgánicos contaminantes presentes, se puede preferir una relación molar superior a 1:1 para mejorar las eficiencias de extracción del ácido malónico.

**Ejemplo 40: Aumento de los rendimientos de la extracción de ácido malónico de la fase orgánica de trioctilamina/1-octanol aumentando la fuerza iónica de la fase acuosa.**

- 15 En este ejemplo, se demuestran procedimientos para extraer el ácido malónico de una fase orgánica que consiste en una trioctilamina en 1-octanol y en una fase acuosa.

Se añadió ácido malónico al agua hasta una concentración final de 100 g/l y se extrajo en una fase orgánica que consiste en trioctilamina (utilizada en una proporción molar de 1:1 de ácido malónico) disuelto en 1-octanol. Se extrajeron 10 ml de solución acuosa en 10 ml de fase orgánica a 18°C durante 18 horas. La fase orgánica se separó luego por centrifugación (x4000 g, 5 min). También se tomaron muestras de la fase acuosa para cuantificar la concentración de ácido malónico no extraído.

Luego se mezclaron 250 µl de fase orgánica con 250 µl de soluciones acuosas a la concentración iónica de cloruro de sodio o hidróxido de sodio. Las muestras se mezclaron por inversión a 18 °C durante 18 horas. Las muestras se centrifugaron (x18.000 g, 1 min) y se tomaron muestras de la fase acuosa para el análisis de la concentración de ácido malónico por HPLC como se describe para el Ejemplo 36.

- 25 Los datos presentados a continuación se normalizaron a la concentración de ácido malónico que se extrajo de nuevo en agua destilada. La adición de 0,5 molar de cloruro de sodio o hidróxido de sodio aumentó los rendimientos de la reacción de retroextracción en más de 25 veces. La adición de cloruro de sodio por encima de 1,5 M disminuyó de nuevo los rendimientos de extracción; sin embargo, con hidróxido de sodio, los rendimientos de extracción continuaron mejorando con la adición adicional de hidróxido de sodio. Los rendimientos de retroextracción aumentarán aún más si se repiten las reacciones de extracción a una temperatura elevada (es decir, por encima de 18 °C). Concentración milimolar de NaCl y cantidad de mejora: 0 mM, 1; 0,5 mM, 27,3; 1 mM, 43,1; 1,5 mM, 74,5; 2 mM, 63,4; 2,5 mM, 66,5; 3 mM, 69,4; 3,5 mM, 63,7; 4 mM, 57,8; 4,5 mM, 53,3; y 5 mM, 45,2. Concentraciones milimolares de NaOH y cantidad de mejora: 0 mM, 1; 0,5 mM, 33,6; 1 mM, 46,5; 1,5 mM, 57,5; 2 mM, 52,7; 2,5 mM, 56,4; 3 mM, 62,6; 3,5 mM, 58,2; 4 mM, 68,5; 4,5 mM, 67; 5 mM, 74,2.

**35 Ejemplo 41: Purificación del ácido malónico a partir de una solución acuosa mediante esterificación y posterior separación de fases**

En este ejemplo, se demostró esterificación del ácido malónico y el etanol para formar malonato de dietilo y la posterior separación de la fase del malonato de dietilo en una fase orgánica de hexano.

- 40 Se prepararon 500 µl de soluciones acuosas que contenían ácido malónico a una concentración de 100 g/l, etanol a la concentración indicada y ácido sulfúrico a la concentración indicada. El ácido malónico y el etanol fueron los sustratos para formar malonato de dietilo; el ácido sulfúrico se añadió como catalizador. Se añadió una capa orgánica de 250 µl de hexano a cada una de las muestras, se mezclaron por inversión durante 18 horas a 25 °C y presión atmosférica, se centrifugaron (x 18.000 g) durante 1 minuto, y se tomaron muestras de la fase acuosa para el análisis de la concentración de ácido malónico por HPLC como se describe en el Ejemplo 36.

- 45 El consumo de ácido malónico se midió por la disminución de la concentración de ácido malónico en la fase acuosa. La concentración basal de ácido malónico (es decir, 100 % de ácido malónico sin reaccionar) en la fase acuosa se estableció a partir de una muestra que contenía 0 % en v/v de etanol y 0 % en v/v de ácido sulfúrico.

La adición de etanol y ácido sulfúrico a la mezcla de reacción fue necesaria para catalizar la esterificación del ácido malónico. Las condiciones de reacción más preferentes, medidas por el porcentaje de consumo de ácido malónico, se lograron altas concentraciones de etanol y ácido sulfúrico. Concretamente, fueron necesarios más del 40 % en v/v de etanol (7,14 de relación molar respecto al ácido malónico) y más del 10 % en v/v de ácido sulfúrico (1,94 de relación molar con respecto al ácido malónico) para catalizar el consumo casi completo de ácido malónico. Los resultados de esta demostración son los siguientes: las reacciones de esterificación se realizaron con etanol al 5, 10, 20, 30, 40 y 50 % (V/V). El ácido malónico que quedaba en la fase acuosa era el siguiente: con 5 % (V/V) de ácido sulfúrico 78,9 %, 61,6 %, 43,2 %, 43,2 %, 28,2 % y 16,6 %; 10 % (V/V) de ácido sulfúrico 83,5 %, 70,3 %, 49,5 %, 28,6 %, 16,6 % y 8,5 %; 5 % (V/V) de ácido sulfúrico 71,8 %, 53,2 %, 28,1 %, 11,8 %, 4,4 % y 0,6 %, respectivamente. El control sin ácido mostró 95,1 %, 93,2 %, 85,8 %, 69,1 %, 63,0 % y 87,3 % de malonato restante

en las soluciones respectivas con etanol. La adición de ácido sin etanol presente da como resultado que las siguientes concentraciones de ácido malónico permanezcan en la fase acuosa: 96,1 %, 92,7 % y 84,4 % para ácido sulfúrico al 5, 10 y 20 % (V/V), respectivamente.

**Ejemplo 42: Mejora de la biosíntesis de malonato en levaduras diseñadas por ingeniería mediante el aumento de la actividad de la acetil-CoA carboxilasa**

Además de los procedimientos, vectores y células huésped para la expresión de una malonil-CoA hidrolasa heteróloga y producción *in vivo* de malonato, la invención también proporciona procedimientos y células huésped para mejorar el título, el rendimiento, y/o la productividad del malonato. En un aspecto, la producción de malonato se mejora al aumentar la biosíntesis de malonil-CoA. El malonil-CoA es el penúltimo intermedio en la biosíntesis de malonato a partir de acetil-CoA, y en *S. cerevisiae*, esta reacción es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC1).

En este ejemplo, el ACC de la levadura *Yarrowia lipolytica* CLIB122 (secuencia de referencia del NCBI: XP\_501721) se retrotradujo a una secuencia de ADN utilizando tablas de optimización de codones estándar para la expresión en *S. cerevisiae*. El resultado en la secuencia de ADN de YIACC se incluye a continuación como SEQ ID NO: 11.

El ADN que codifica 50 nucleótidos del homólogo FAA1 de *S. cerevisiae* aguas arriba seguido de 300 pares de bases de la secuencia del promotor TEF1 de *S. cerevisiae* seguido de la secuencia YIACC (SEQ ID NO: 11) y finalmente se sintetizaron 50 nucleótidos de *S. cerevisiae* FAA1 aguas abajo como una sola pieza de ADN de oligonucleótidos utilizando protocolos estándar y amplificado por PCR. El producto de la PCR de YIACC flaqueado resultante y una construcción de ADN lineal que contiene el gen URA3 seleccionable y las secuencias homólogas de FAA1 flanqueantes, para dirigir la recombinación en el sitio FAA1 en el cromosoma, se cotransformaron en BY4741 que contenía 2 copias de malonil-CoA hidrolasa F6AA82-2 proporcionadas por la invención (cepa LYM004), utilizando un procedimiento estándar de transformación con acetato de litio, y se seleccionaron para sembrar en placas de medio definido sintético que contiene 2 % de glucosa (SD) y que carece de uracilo (-Ura). Los clones y el ADN genómico correspondiente se aislaron y verificaron mediante PCR para contener la integración de YIACC en FAA1.

Para la producción de malonato *in vivo*, se inoculó una colonia individual para cada transformante seleccionado en una parte alícuota de 50  $\mu$ l de medio SD-Ura en una placa de 96 pocillos. LYM004 se cultivó para comparar la levadura que carece de expresión de un YIACC heterólogo. La placa se incubó en un agitador a 30 °C durante aproximadamente 4 horas y se utilizaron 25  $\mu$ l de estos pre-cultivos para inocular las placas de fermentación. En este ejemplo, se usaron 2 ml de medio SD en placas de 48 pocillos para la fermentación. Las placas de fermentación se cubrieron con una membrana transpirable, se incubaron en un agitador de placas a 30 °C y se tomaron muestras para el análisis de HPLC de la acumulación del producto después de 72 y 120 h de fermentación. El análisis de HPLC de la acumulación de malonato en el caldo de fermentación se realizó como se describe en el ejemplo 36.

No se detectó malonato en muestras compuestas únicamente de medio. LYM004 que expresa YIACC produjo 1,94 y 2,43 veces más malonato a las 72 y 120 h, respectivamente, que LYM004 solo. La concentración más alta de malonato medida en los medios de fermentación se observó en muestras recolectadas después de 120 h de fermentación.

**Ejemplo 43: Producción de malonato en *S. cerevisiae* utilizando malonil-CoA hidrolasa F6AA82**

En este ejemplo, las veinte mutaciones puntuales de aminoácidos proteogénicos se introdujeron en la posición E95 en la proteína F6AA82 (Q348A). Se creía que la posición 95 del aminoácido interactuaba con el término de malonil-CoA, y la mutación de E95 introduciría actividad malonil-CoA hidrolasa en la proteína.

Los mutantes F6AA82 (Q348A) en la posición 95 (es decir, todos los aminoácidos) se construyeron utilizando procedimientos estándar y se clonaron en un plásmido de levadura que contiene un marcador auxotrófico de uracilo, un origen de replicación CEN/ARS, un promotor de TEF y terminador de CYC. Los mutantes F6AA82 se clonaron detrás del promotor TEF y directamente aguas arriba del terminador CYC. Todos los plásmidos contenían un marcador de resistencia a la ampicilina y un origen ColE1 para la propagación del plásmido en *E. coli*.

Los plásmidos se transformaron en *S. cerevisiae* utilizando un procedimiento de acetato de litio y los transformantes se seleccionaron en placas de agar SD -Uracilo a 30 °C. Doce colonias de cada mutante se inocularon en precultivos de 500  $\mu$ l de medio SD -Ura en una placa de 96 pocillos y se incubaron ~ 16 h con agitación a 30 °C. Se usó una parte alícuota de 5  $\mu$ l de estos precultivos para inocular placas de producción de 96 pocillos que contienen 500  $\mu$ l de RD4 -Ura (1X YNB, suplemento 3X SC, 2 % de glucosa, tampón de ácido succínico 75 mM, pH 4,0, sin de uracilo). Las placas de producción se incubaron a 30 °C con agitación durante 3 días antes de muestrear el caldo de fermentación. Las muestras se clarificaron por centrifugación y se filtraron en una membrana de 0,45  $\mu$ m antes del análisis por HPLC. El análisis de HPLC de la acumulación de malonato en el caldo de fermentación se realizó como se describe en el ejemplo 36.

La producción de cada mutante F6AA82 (que contiene la mutación Q348A además de las mutaciones E95 descritas), en estas condiciones, fue la siguiente: F6AA82 (E95N) 8,03  $\pm$  0,14 mM, F6AA82 (E95S) 4,18  $\pm$  0,61 mM, F6AA82 (E95Y) 3,87  $\pm$  0,30 mM, F6AA82 (E95A) 2,33  $\pm$  0,50 mM, F6AA82 (E95K) 1,65  $\pm$  0,23 mM, F6AA82 (E95T)

1,16 ± 0,62 mM, F6AA82 (E95D) 0,75 ± 0,27 mM, F6AA82 (E95F) 0,17 ± 0,13 mM, F6AA82 (E95V) 0,11 ± 0,32 mM, F6AA82 (E95L) 0,11 ± 0,12 mM, F6AA82 (E95G) 0,00 ± 0,01 mM, F6AA82 (E95P) -0,31 ± 0,78 mM, F6AA82 (E95R) -0,32 ± 0,69 mM, F6AA82 (E95) -0,32 ± 0,40 mM, F6AA82 (E95W) -0,34 ± 0,73 mM, F6AA82 (E95Q) -0,37 ± 0,74 mM, F6AA82 (E95H) -0,53 ± 0,70 mM, F6AA82 (E95C) -0,57 ± 0,69 mM, F6AA82 (E95I) -0,64 ± 0,81 mM, y F6AA82 (E95M) -0,77 ± 0,79 mM. Las concentraciones negativas de malonato se debieron a que los títulos de producción cayeron por debajo del nivel detectable de HPLC e indicaron la ausencia de producción de malonato.

F6AA82 (Q348A) proteínas que contienen mutaciones E95S, E95Y, E95T, E95N, E96K, E95V y E95D produjeron significativamente (prueba t, p <0,05) más malonato que la proteína F6AA82 (Q348A). Las proteínas F6AA82 que contienen estas mutaciones son adecuadas para la hidrólisis de malonil-CoA y la producción de malonato. Las mutaciones de F6AA82 E95S y E95N son preferentes para la hidrólisis de malonil-CoA y la producción de malonato.

E95Y, E95T, E95K, E95V y E95D produjeron significativamente (prueba t, p <0,05) más malonato que la proteína F6AA82 de tipo salvaje. Las proteínas F6AA82 que contienen estas mutaciones son adecuadas para la hidrólisis de malonil-CoA y la producción de malonato.

#### Ejemplo 44: Impacto de la selección del promotor en la producción de malonato en *S. cerevisiae*

En este ejemplo, un esqueleto plasmídico de expresión que comprende un origen de replicación CEN/ARS, un origen de replicación PMB1, un marcador de resistencia a la ampicilina, un marcador *URA3* y un marcador *hph* se amplificaron a partir del plásmido Y20. La malonil-CoA hidrolasa F6AA82-2 flanqueada por el terminador CYC1 se amplificó por PCR a partir del plásmido Y1-F6AA82-2 y se ensambla con el esqueleto utilizando técnicas estándar. El plásmido resultante, pPLIB0-Q9I, se usó como una columna vertebral para la clonación de los diferentes promotores seleccionados.

Se seleccionaron noventa y seis genes de referencia de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*. Las secuencias promotoras de estos genes se generaron mediante amplificación por PCR, utilizando el ADN genómico de la cepa de *S. cerevisiae* BY4741 como molde, fragmentos de ácido nucleico correspondientes a aproximadamente 750 pares de bases inmediatamente aguas arriba de su marco de lectura abierto, incluyendo el codón de inicio del gen de interés. Utilizando técnicas de clonación estándar, estas secuencias promotoras se clonaron inmediatamente aguas arriba de F6AA82-2 (codón de inicio en 3739 en la SEQ ID NO: 12) en pPLIB0-Q9I. Los plásmidos resultantes se propagaron en *E. coli* y la presencia del promotor deseado se verificó mediante secuenciación.

Los plásmidos descritos anteriormente se utilizaron para transformar *S. cerevisiae* BY4741 utilizando procedimientos estándar de acetato de litio. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar de medio CSM sin uracilo a 30 °C. Un transformante que alberga cada plásmido se inoculó en una placa de precultivo que consistía en 300 µl de medio RD -Ura (2X YNB, 3X SC-U, 2 % de glucosa) en una placa de 96 pocillos. La placa de pre-cultivo se incubó a 30 °C aproximadamente 20 h con agitación, y se utilizaron 30 µl de estos pre-cultivos para inocular placas de producción que consisten en 1,8 ml de medio RD4-Ura (2X YNB, 3X SC-U, 2 % de glucosa, tampón de succinato 75 mM, pH 4,0) en placas de cultivo de 48 pocillos (1 pocillo de producción para cada precultivo). Las placas se incubaron a 30 °C con agitación durante 144 h antes de tomar una muestra del caldo de fermentación. Las muestras se clarificaron por centrifugación y se filtraron en una membrana de 0,45 µm antes del análisis por HPLC.

El análisis de HPLC de la acumulación de malonato en el caldo de fermentación se realizó como se describe en el ejemplo 36. La concentración de malonato milimolar en el caldo de fermentación después de 144 h de fermentación con diferentes promotores que conducen la expresión de F6AA82-2 es la siguiente: HSP150 8.8; PGK1 8.6; PHO5 8.5; SCT1 7.8; PRB1 7.6; TPI1 7.1; ACH1 7; HXK2 6.9; ACO1 6.9; JEN1 6.9; MDH2 6.8; POX1 6.6; CIT1 6.6; ALD4 6.6; ADH1 6.5; TDH3 6.4; ADH2 6.4; SDH1 6.4; TDH1 6.1; MLS1 6.1; RPN6 6; GLK1 5.9; POT1 5.8; HSP26 5.8; FBA1 5.7; LPD1 5.7; CYC1 5.5; COX5a 5.5; TEF1 5.5; SHH4 5.5; GND2 5.5; TPS1 5.5; MDH1 5.4; PDC1 5.4; HXK1 5.3; TDH2 5.3; IDH2 5.3; DDR2 5.2; SLT2 5.2; ENO2 5.1; COX6 5; CHO1 4.9; PHO3 4.9; PFK1 4.9; ACS1 4.9; GUT2 4.8; PHM7 4.8; CIT2 4.7; ACS2 4.7; ALD2 4.5; IDH1 4.5; IDP2 4.5; FBP1 4.3; PHO12 4.3; PDC5 4.2; PFY1 4.1; GDH1 4.1; PEX13 4.1; ICT1 4.1; YSA1 4; KGD2 3.9; GIM5 3.9; GAP1 3.9; DBP5 3.8; STE5 3.7; BIO2 3.7; PDC6 3.6; HXT5 3.6; REG1 3.6; TPS3 3.5; BIO5 3.3; PHO8 3.3; IRC7 3.2; GPM1 3.2; ALA1 3.1; KGD1 3.1; MIG1 3.1; YKT6 2.9; SNO4 2.8; ARA1 2.8; PDR10 2.7; YBR139W 2.3; ERR2 2.2; CRC1 1.9; TSL1 1.3; ENO1 1.2; PFK2 1.1; RPL6A 1.1 Como muchos de estos promotores no tienen nombre, el código del número de letra delante de cada número indica el gen inmediatamente corriente abajo del promotor clonado, en la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*.

Este ejemplo demuestra que se puede usar una amplia variedad de promotores para controlar la expresión de una malonil-CoA hidrolasa para producir malonato *in vivo* en levadura. Además, 40 promotores diferentes dieron lugar a títulos de al menos malonato 5 mM y 7 promotores dieron como resultado la producción de al menos 7 mM en este experimento.

#### Ejemplo 45: Integración de un gen que codifica malonil-CoA hidrolasa en el genoma de *S. cerevisiae* para la producción de malonato.

En este ejemplo, Se usó la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* como cepa huésped, para la integración genómica de la malonil-CoA hidrolasa proporcionada por la invención. Se eligieron tres sitios en el genoma de *S. cerevisiae* para la integración de las construcciones de ácidos nucleicos sintéticos en esta cepa y los tres casetes de ácidos nucleicos

lineales que se integraron en cada uno de ellos portaron sitios de homología únicos para la integración objetivo y un marcador seleccionable único codificado corriente arriba del malonil CoA hidrolasa. En los tres casos, el ácido nucleico que codifica la hidrolasa de malonil-CoA F6AA82 (E95S/Q348A) flanqueado por el promotor TEF1 y el terminador CYC1 se utilizó como la porción de expresión del casete.

- 5 En dos casos, las repeticiones largas de un solo terminal YPRCdelta15 y YORWdelta22 ADN no codificante del cromosoma, fueron el objetivo para la integración. En el tercer caso, un casete de malonil-CoA hidrolasa proporcionado por la invención (F6AA82 (E95S/Q348A)) se integró en lugar del gen BUD21. Las secuencias de estos casetes de inserción lineal se incluyen a continuación como SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. Los sitios de integración únicos y los marcadores seleccionables son YPRCdelta15 (HIS3), YORWdelta22 (LEU2) y BUD21 (URA3), respectivamente.

- 10 Estos casetes de ácido nucleico se construyeron y transformaron en *S. cerevisiae* BY4741 usando protocolos estándar. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar hechas de medio SC con abandonos de aminoácidos apropiados a 30 °C. Se volvieron a sembrar por rayado varios transformantes para cada construcción en placas de agar selectivas. Los transformantes se seleccionaron y verificaron por producción de malonato y por PCR. Las siguientes cepas resultaron de estas integraciones: LYM002 contiene 1 copia de F6AA82 (E95S/Q348A) integrada en YPRCdelta15 (HIS3); LYM004 lleva 2 copias de F6AA82 (E95S/Q348A), una en YPRCdelta15 (HIS3) la segunda en YORWdelta22 (LEU2); LYM007 se deriva de LYM004 y tiene una tercera copia de F6AA82 (E95S/Q348A) integrada en el locus BUD21.

- 15 Para la fermentación y producción de malonato, *S. cerevisiae* BY4741 portador del plásmido Y1-F6AA82 (E95S/Q348A) sirvió como control positivo. Los pre-cultivos de 500 µl de medio RD4 en una placa de 96 pocillos se incubaron 16-20 h con agitación a 30 °C. Se usó una parte alícuota de 5 µl de estos pre-cultivos para inocular placas de producción de 96 pocillos que contienen 500 µl de medio RD4 (1X YNB, suplemento 3X SC, 2 % de glucosa, tampón de ácido succínico 75 mM pH 4,0). Las placas de producción se incubaron a 30 °C con agitación durante 120 h antes del muestreo del caldo de fermentación. Las muestras se prepararon y analizaron por HPLC como se describe en el Ejemplo 36.

- 20 Se usó una curva estándar establecida con un estándar auténtico para determinar la concentración de malonato en el caldo de fermentación. Los niveles de producción de ácido malónico de estas fermentaciones fueron los siguientes *S. cerevisiae* BY4741 + Y1-F6AA82 (E95S/Q348A), 2,6 ± 0,4 mM; LYM002, 3,2 ± 0,2 mM; LYM004, 4,6 ± 0,2 mM; LYM007, 7,7 ± 0,3 mM.

- 25 Este ejemplo ilustra los beneficios de la integración genómica de un gen que codifica hidrolasa de malonil-CoA proporcionado por la invención en que una sola copia integrada del gen da como resultado títulos de ácido malónico mayores que el mismo gen expresado a partir de un plásmido. Este ejemplo también sirve para demostrar la modulación del ácido malónico por la invención a través del número de genes que codifican malonil-CoA hidrolasa que están presentes en la célula.

- 30 **Ejemplo 46: Expresión de acetil-CoA sintetasas para aumentar la producción de malonato a partir de una célula huésped diseñada por ingeniería.**

- 35 Las acetil-CoA sintetasas (ACS) son comunes a muchos organismos. Estas enzimas producen acetil-CoA utilizando acetato y trifosfato de adenosina (ATP) como sustratos. De acuerdo con la presente invención, estas enzimas se pueden usar para convertir el acetato de cualquier fuente, incluyendo el metabolismo endógeno, hidrólisis de la materia prima, o por alimentación en acetil-CoaA, El penúltimo precursor en la biosíntesis de malonil-CoA. Al aumentar los niveles de acetil-CoA, se puede aumentar malonil-CoA, y por lo tanto, malonato, en las células huésped proporcionadas por la invención.

- 40 Se puede obtener un ACS ilustrativo adecuado para este propósito a partir de la bacteria *Salmonella enterica*. Para expresarla ACS de *S. enterica* (SeACS) en *S. cerevisiae*, la secuencia de aminoácidos se tradujo de nuevo a una secuencia de ADN utilizando tablas de optimización de codones y se determinó que un resto estaba involucrado en la disminución de la actividad enzimática (L641P). La secuencia de ADN optimizada en codón resultante proporcionada por la invención es la SEQ ID NO:44.

- 45 Los ácidos nucleicos que codifican el SeACS1 (L641P) se sintetizaron *de novo* a partir de oligonucleótidos y se insertaron en un plásmido de levadura, Y1, bajo el control del promotor TEF1 de *S. cerevisiae* utilizando protocolos estándar. Este plásmido también contiene un origen CEN/ARS y un gen para conferir prototrofia de uracilo. Los clones de LYM004 que contienen este plásmido se seleccionaron mediante placas en placas de uracilo SD y se verificó que contenían el gen SeACS1 (L641P) mediante secuenciación.

- 50 Se usó LYM004 como huésped para la expresión de la acetil-CoA sintetasa SeACS1 (L641P). Para la producción de malonato *in vivo*, se inoculó una colonia individual para cada transformante seleccionado en una parte alícuota de 50 µl de medio SD-Ura en una placa de 96 pocillos. LYM004 se cultivó para comparar la levadura que carece de expresión de una SeACS1 heteróloga (L641P), pero que contiene un vector vacío Y1. La placa se incubó en un agitador a 30 °C durante aproximadamente 48 h, y se utilizaron 50 µl de estos pre-cultivos para inocular las placas de fermentación. En este ejemplo, se usaron 500 µl de medio RD4U en placas de 96 pocillos para la fermentación.

- 55

Las placas de fermentación se cubrieron con una membrana transpirable, se incubaron en un agitador de placas a 30 °C y se tomaron muestras para el análisis de HPLC de la acumulación de producto después de 120 h de fermentación. El análisis de HPLC se realizó como se describe en el Ejemplo 36.

- 5 No se detectó malonato en muestras que consistían en un medio no inoculado con células de levadura. En las condiciones probadas, LYM004 que expresaba SeACS1 produjo 1,86 veces más ( $5,5 \pm 0,62$  mM) de malonato a las 120 h que LYM004 con un control de Y1 vacío solo, ilustrando así las mejoras en la producción de malonato proporcionadas por esta realización de la invención.

**Ejemplo 47: Utilización de diferentes fuentes de carbono para la producción de malonato utilizando una cepa modificada de *Pichia kudriavzevii*.**

- 10 La cepa LPK3003 se derivó de la cepa Y-134 de *Pichia kudriavzevii* (obtenida de los Servicios de Investigación Agrícola del USDA, Peoria, IL) por integración genómica de un casete de ácido nucleico que codifica la *hph* higromicina fosfotransferasa (que confiere resistencia a la higromicina B) controlada por el promotor PkTEF1, y la F6AA82 (E95S/Q348A) malonil-CoA hidrolasa dirigida por el promotor PkTDH1.

- 15 Los cultivos de siembra de LPK3003 se cultivaron durante 16-20 h en medio YPD con agitación a 30 °C. Este cultivo de semilla se utilizó para inocular 1.1X YNB, que luego se dividió en alícuotas a 450 µl por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl de soluciones de diversas fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, etanol, glicerol o acetato de sodio a cada pocillo (por triplicado) a una concentración final del 2 % (p/v). La placa se incubó a 30 °C con agitación durante 115 h y se tomaron muestras del caldo de fermentación. Las muestras se prepararon y analizaron por HPLC como se describe en el Ejemplo 36.

- 20 En este ejemplo, se observó poco o ningún crecimiento para las fuentes de sacarosa o acetato de carbono, y la acumulación de malonato fue insignificante en estas muestras. Como se ha descrito anteriormente, las células huésped pueden modificarse para conferir o mejorar el catabolismo de sacarosa y/o acetato introduciendo una sacarosa invertasa y/o acetil-CoA sintasa (ACS), respectivamente. Las otras fuentes de carbono probadas en este ejemplo dieron como resultado la acumulación de malonato (réplicas promedio  $\pm$  S.D.):  $4,6 \pm 0,5$  mM de glucosa,  $5,38 \pm 0,05$  mM de glicerol y  $3,7 \pm 0,3$  mM de etanol.

Estos resultados demuestran que se pueden usar diversas fuentes de carbono para producir malonato a partir de una cepa diseñada por *Pichia kudriavzevii* que expresa una malonato-CoA hidrolasa. Notablemente, el glicerol proporcionó los títulos más altos en este ejemplo.

**Ejemplo 48: Producción en biorreactor de malonato.**

- 30 En este ejemplo, la cepa de levadura LYM004 (véase el Ejemplo 45 para los detalles de construcción) se cultivó en un control alimentado por lotes en un biorreactor de 0,5 l. Se aisló una colonia única de LYM004 de una placa SC y se cultivó en 5 ml de medio RD4 (véase el Ejemplo 43 para la receta). El cultivo se mantuvo a 30 °C durante la noche, agitando a 200 rpm. Los 4 ml de cultivo se usaron para inocular 50 ml de medio RD4 fresco en un matraz de 250 ml sin deflector y se cultivaron durante la noche a 30 °C, 200 rpm. La absorbancia DO600 nm a tiempo cero fue de 0,304. Después del crecimiento durante la noche (16 h), este cultivo se usó para inocular 1 l de medio RD4. Este cultivo se dividió en 2 partes alícuotas de 500 ml separadas y se añadió a dos biorreactores separados. Ambas fermentaciones se mantuvieron a 30 °C, con un solo impulsor que funciona a 400 rpm y una velocidad de rociado de 1 volumen de recipiente por minuto (VVM) utilizando aire comprimido. Los cultivos se cultivaron durante la noche (21 h) para permitir el consumo de glucosa antes de comenzar la fase de alimentación discontinua. La alimentación (receta más adelante) se liberó durante 2 segundos, cada 980 segundos. Se tomaron muestras de 0,5 ml diariamente y se analizaron para determinar la producción de ácido malónico. Después de 4 días, los cultivos habían acumulado 34 mM de ácido malónico y alcanzaron una DO 600 nm de 16,2. Después de 9 días, los cultivos habían acumulado 116 mM de ácido malónico y alcanzaron una DO 600 nm de 52,1.

- 45 El medio de alimentación discontinua consistió en 17 g/l de Difco YNB; 50 g/l de sulfato de amonio; 49,8 g/l de suplemento sintético completo (SC) sin histidina, metionina y leucina; 2,57 g/l de metionina; 8,85 g/l de ácido succínico y 20 g/l de glucosa; el pH se ajustó a 4,0.

- Este protocolo se repitió con una cepa, LYM007, que expresaba 3 copias de una malonil-CoA hidrolasa (véase el Ejemplo 45). En este ejemplo, se accionó un solo impulsor a 700 rpm y la composición de la alimentación fue la siguiente: 68 g/l de YNB (Sigma), 16,6 g/l de SC-his-met-leu (Sunrise Science), 1,284 g/l de metionina, tampón de succinato 75 mM (pH 4,0), 400 g/l de glucosa. La velocidad de alimentación utilizada fue el ciclo de 5 s cada 980 s. Se tomaron muestras de 0,2 ml diariamente y se analizaron para determinar la producción de ácido malónico, ácido acético, ácido succínico, ácido pirúvico a través de HPLC. El crecimiento se controló midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO600). La DO600 y la concentración de malonato de cada punto de tiempo fueron las siguientes: 18 horas, DO = 6,9, 3,2 mM; 45 horas, DO = 13,8, 14,0 mM; 69 horas, DO = 16,6, 24,2 mM; 88,5 h DO = 24,4, 31,1 mM; 55 111,8 horas, DO = 36,9, 47,8 mM.

En un ejemplo comparativo, LPK3003 (véase el Ejemplo 47) se cultivó en un control alimentado por lotes en un fermentador de 0,5 l. Se aisló una colonia única de LPK3003 de una placa de YPD y se cultivó en 5 ml de medio

YPD. El cultivo se cultivó a 30 °C durante la noche, agitando a 200 rpm. Los 5 ml de cultivo se utilizaron para  
 5 inocular 50 ml de medio mínimo fresco, que contenía 6,8 g/l de YNB (Difco) y 2 g/l de glucosa y se cultivó durante la  
 noche a 30 °C, 200 rpm. Este cultivo se usó luego para inocular 500 ml de 6,8 g/l de medio YNB (Difco), 2 g/l de  
 glucosa y se cultivó en un fermentador de 1 litro. La temperatura se mantuvo a 30 °C, se accionó un solo impulsor a  
 700 rpm y la velocidad de rociado se ajustó a 1 volumen de recipiente por minuto (VVM) utilizando aire comprimido.  
 Los cultivos se cultivaron durante la noche durante 21 h para permitir el consumo de glucosa antes de comenzar la  
 fase de alimentación discontinua. Una alimentación, que contenía 68 g/l de YNB y 400 g/l de glucosa se inició  
 10 configurando la alimentación del fermentador para que realizara un ciclo cada 980 s durante 5 s. Se tomaron  
 diariamente muestras de 200 ul y se analizaron para determinar el crecimiento (DO600) y la producción de ácido  
 malónico (como se describe en el Ejemplo 36). La formación de espuma se controló mediante la adición de 200 ul de  
 antiespumante en cada intervalo de muestreo. El pH se midió y se ajustó a 4,5 con NaOH 10N en cada intervalo de  
 muestreo. La producción de ácido malónico continuó más allá de 111 h, acumulando 36,4 mM de ácido malónico.  
 Cabe destacar que esta es la primera demostración de producción sin adición de aminoácidos, uracilo o adenina. La  
 15 DO600, La concentración de malonato y el pH de cada punto de tiempo fue el siguiente: 18 horas, DO = 2,1, 0,7  
 mM, pH = 2,3; 45 horas, DO = 12,2, 8,8 mM, pH = 2,0; 69 horas, DO = 12,8, 18,1 mM, pH = 2,0; 88,5 horas, DO =  
 27,6, 22,9 mM, pH = 2,7; 111,8 horas, DO = 40,1, 36,4 mM, pH = 2,4; 194 horas, DO = 60,6, 94 mM, pH = 3,3.

Mientras que el título de malonato fue mayor en LYM007, las condiciones bajo las cuales se puede cultivar LPK3003  
 (medio mínimo, pH bajo) y el hecho de que contiene solo una copia de malonil-CoA hidrolasa F6AA82-2 hacen de  
 esta una cepa superior para esfuerzos de ingeniería adicionales.

20 **Listado de secuencias**

**SEQ ID NO: 1.** Secuencia de aminoácidos de 3-hidroxiopropionil-CoA hidrolasa EHD3 de *Saccharomyces cerevisiae*  
 de tipo salvaje.

1-	MLRNTLKCAQ	LSSKYGFKTT	TRTFMTTQPQ	LNVTDAPPVL
41-	FTVQDTARVI	TLNRPKKLNA	LNAEMSESMF	KTLNEYAKSD
81-	TTNLVILKSS	NRPRSFCAGG	DVATVAIFNF	NKEFAKSIKF
121-	FTDEYSLNFM	IATYLKPIVT	FMDGITMGGG	VGLSIHTPFR
161-	IATENTKWAM	PEMDIGFFPD	VGSTFALPRI	VTLANSNSQM
201-	ALYLCLTGEV	VTGADAYMLG	LASHYVSSSE	LDALQKRLGE
241-	ISPPFNNDPQ	SAYFFGMVNE	SIDFVSPLP	KDYVFKYSNE
281-	KLNVIACFN	LSKNGTIEDI	MNLRQYEGS	AEKKAFAQEI
321-	KTKLLTKSPS	SLQIALRLVQ	ENSRDHIESA	IKRDLYTAA
361-	MCMNQDSLVE	FSEATKHKLI	DKQRPYPWT	KKEQLFVSQL
401-	TSITSPKPSL	PMSLLRNTSN	VTWTQYPYHS	KYQLPTEQEI
441-	AAIEKRTND	DTGAKVTERE	VLNHFANVIP	SRRGKLGIQS
481-	LCKIVCFERKC	FEVNDGIRWK	-500	

**SEQ ID NO:2.** Secuencia de ácido nucleico de *Haemophilus influenzae* de tipo salvaje que codifica YciA acil-CoA  
 hidrolasa.

1-	ATGTTTTACA	CTGAAACTTATGATGTGATTGTGATCGGTG
41-	GTGGTCATGC	GGGTACAGAAGCCGCACTTGACCAGCTCG
81-	TATGGGATTT	AAAACCCTTTTATTAACACATAATGTAGAT
121-	ACTTTAGGGC	AAATGTCTTGTAACCCCTGCAATTTGGTGGGA
161-	TCGGTAAAGG	TCATTTAGTAAAAGAAGTAGATGCAATGGG
201-	CGGTTTAATG	GCGCATGCTGCAGATAAAGCAGGGATCCAA
241-	TTTCGTA	TAAATAGCAGTAAAGGCCCAGCAGTGC
281-	CTACTCGAGC	TCAAGCTGACAGAGTTCTATATCGTCAAGC
321-	TGTTTCGTA	GCATTAGAAAATCAACCTAATTTAGATATT
361-	TTCCAACAAG	AAGCGACCGATATTCTGATTAAGCAAGATC
401-	GAGTTACAGG	CGTTAGCACAAAAATGGGATTAACCTTTTCG
441-	TGCTAAATCA	GTGGTATTAACCTGCGGGTACTTTCTTAGCT
481-	GGTAAAATTC	ATATTGGTTTGAAAATATGAAGGTGGCC
521-	GTGCAGGGGA	TCCTGCTTCTGTAAATCTTTCACATCGATT
561-	AAGAGATCTC	GGATTACGTGTAGATCGCCTTAAAAACAGGT
601-	ACACCGCCGC	GTATTGATGCACGTACGATCAATTTTGATA
641-	TTTTAGCTAA	ACAACACGGTGATGCTGTTTTTACCTGTGTT
681-	TTCTTTTATG	GGATCAGTTGATGATCACCTCAACAAATTT
721-	CCTTGTTATA	TAACCTATACCAATGAACAAACCCATGAAG
761-	TGATCCGTAA	TAACCTGGATCGCAGTCCAATGTATACTGG
801-	TGTGATTGAA	GGGATCGGTCCACGTTTATGCCCATCCATT
841-	GAAGATAAAG	TGATGCGTTTTCTCGGATCGTAATTCACATC
881-	AAATTTATTT	AGAACCAGAAGGCTTAACCAGTAATGAAGT
921-	GTATCCAAAC	GGGATCTCTACCAGTTTACCCTTTGACGTG
961-	CAAATGGGCA	TTGTGAATTC TATGAAAGGT TTAGAAAACG

-1000

ES 2 698 500 T3

**SEQ ID NO:3** secuencia de aminoácidos del factor de transcripción de unión a malonato de *Acinetobacter calcoaceticus* MdcY.

1-	MNSIAELPLS	IQISKLEDD	IIYGFYLPGT	KLDEQELCER
41-	YGASRTPIRE	ALKLLAAEGL	VEIRPRRGAI	IPTINPLTLC
81-	EMFEVMAELE	AMCGRLAARR	IQPEEKLELQ	RLHQLCQDYL
121-	NQNDSENYE	ANRLFHFAIY	QASHNAFLIE	QACTLHKRLH
161-	PYRRLQLRVN	NRMNNSFTEH	NEILEAIFAG	NEQQAEALLK
	201-	AHVVIQGGKF	TDFISTIESL	QPKS
				-224

5 **SEQ ID NO: 4.** Secuencia de aminoácidos del factor de transcripción de unión a malonato de *Rhizobium leguminosarum* MatR.

1-	MRKVKRMSEN	VGRWLRDEIE	NSILSNEFSP	GERLDETFLA
41-	TRFGVSRTPV	REALMQLDAI	GLIEIRPRRG	AIVIDPGPHR
81-	VYEMFEVMAE	LEGLAGSLAA	RRLDKTSREA	ITATHGRCEK
121-	SAAAGDSDAY	YYDNEEFHKA	IYAAGRSDFL	EEQCLQLHRR
161-	LRPDRRLQLR	VRNRLSTSFL	EHCAIVDAIF	AGDGDEARRL
201-	LRGHVGIQGE	RFSDLVASMA	AR	-222

**SEQ ID NO:5.** Secuencia de aminoácidos del factor de transcripción de unión a malonato de *Klebsiella pneumoniae* MauR.

1-	MKDDINQEIT	FRKLSVFMFM	MAKGNIARTA	EAMKLSSVSV
41-	HRALHTLEEG	VGCPFLVHKG	RNLLPLQAAW	TLLEYCQDVI
81-	SLMNRGLEAT	RKVAGVGQGR	LRIGTLYSLT	LETVPRIIMG
121-	MKLRPELEL	DLTMGSNQML	LDMLEDDALD	AILIATNEGE
161-	FNNTAFDVVP	LFEDDIFLAA	PATERLDASR	LADLRDYADR
201-	KFVSLAEGFA	TYAGFREAFH	IAGFEPEIVT	RVNDIFSMIS
241-	LVQAGVGFAL	LPGRMKKVYE	KDVQLLKLAE	PYQMRQLISI
281-	VYSHHRERDA	DLLALAAEGR	MYARSINR	-308

10 **SEQ ID NO: 6.** Promotor P<sub>MdcL</sub> regulado por MdcY de *Acinetobacter calcoaceticus*.

1-	AAAAAATTG	TATACAATTT	ATGTTTATTT	GAGTACAAAG
41-	CATTGTACAC	TGAATACAGA	TAGGCTATAA	CTATACC -77

**SEQ ID NO: 7.** Secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa EHD3 EC 3.1.2.4.

1-	-----	-----	MOBUUOB+AQ+UBB+-----+-----
41-	+GFOBBOB--	---+-----	+BUOUUU-----
81-	-----	AQON+++UUUVFUOQJUAROOULNRPKL	OFBULNEYUKSJUNOOOBSUNQPRUOCA
121-	NALNUJMUJU	NOJBBF--	BBUOJFFBUX_YS ONFQOATYOK
161-	GGDVAUOAO+	MGGGVGOUOHUPFROATENTBWAMPMDIG	OPBOOUOANUBUQOAOYLCOGTGJOUGGJA
201-	POOOOJGIT	UBJNOJLJLJBRLEGOBPUJ+OJ+----+UQU	OJEFUUP-OPBJYBFYUNJBLJVIJBCFJ
241-	FFPDVGUUFA	OBBLJJO-+-YJGUJJABJFABJOBJBLO	OBOBJNUBJBOJUAOBBDLTAUNMCON-
281-	YOOGOASHYO	UJAUBBKLOJKQBOPYPWBBB+JJOUOUQO	POULOBNUUNOTWBJYPBBBOYQLPUJUJO
321-	JJFFJJOONJU	N---+G-++OBOUBBJOBBFUNONJUBBJ	OOJBBCUJJJA+GGOBWB+--+-----
361-	OUBOUUOJJO		
401-	UKSPUSOQQA		
441-	+++QJUOQEF		
481-	UUOQUPBPUO		
521-	BQYOBBBJNB		
561-	KOGOJUOQBO		-598

15 **SEQ ID NO: 8.** Secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa de *Bacillus* EC 3.1.2.4.

## ES 2 698 500 T3

```

1- MTEBVLFSOU JNGVAUITLN RPKALNSLSY JMLQPIGQKL
41- KEWEBJJBIA OIVLKGAGUK GFCAGGDIKT LYEARNEOA
81- LQBAEBFFJE XYJIDTYOYQ YBKPIIACLD GIVMGGGVGL
121- TNGABYRIVT JBTKWAMPEM NIGFFPDVGA AYFLNBAPGY
161- UGBYVALUUAU OLKAUDVLF I NAADYFMUJ ULPBFLUJOJ
201- UONWBBJJJV BUBLKJOOB FAUUUUOJUJ LUUOOEJONU
241- HFAFJUOEJI IBSLEBJQUU FAOBUBJULL SKSPOSCLKVT
281- LKQFOJGBJK SOEJCFATDL OLAKNFMRHJ DFFEGVRSOV
321- ODKDQNPYK YBQOUDVUJJ JVNBFNLLN A -351
    
```

### SEQ ID NO: 9. Secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa de *Pseudomonas* EC 3.1.2.4.

```

1- MNOBFEJBUUOBGARIGOAULDAJBULNALULPMIJOLGJ
41- BOBAWABJPGOOCVOLRGNGAKAF CAGGJVBBLOJACBJB
81- PGJOPPLAABFFAJX YRLJB BOHUYPKPOOCWGHGBVOGG
121- GMGLOQGAUORIVTPUURLAMPEOUIGLYPDVGASWFLUR
161- OPBBLGLFOGLUGABONABDAODLJLADRFOBJBQQJJO
201- JJLQONWQEQUJQQLBSLOBAJJBABJJOPJAQOLPRR
241- QBODJOLDQAOAUAWBAOJA OJBBDPLOABAABBQJG
281- CPOUABOVWJQOBRARBSLAJOFBMEYUOSLNCCRHPJF
321- UEGVRARLODBDBQPBWBWPJOAQOPJAOOJAHFJBOWJG
361- BBPOAJOU+++370
    
```

### SEQ ID NO: 10. Secuencia consenso de malonil-CoA hidrolasa de EC 3.1.2.4 bacteriana general.

```

1- -----+-----+-----M+M--TEHOO
41- FUOSENGOASIULNRPBALNSLUYDMOQPOGQBOBEWENJ
81- EROALOLB-GAGTBGFCAGGJOB UOYJARSNEPG+ALQH
121- AERFFEJX_YE OJTYOYQYKKPOOACLDGIOMGGGVGLTNG
161- AKYBOOTERUBWAMPEM NIGFFPDVGAAYFLNBA-----
201- PGLYGRYOALUASIOKASDVONAAJYFMTSJSLPAFOT
241- EOESONWHKEDJOHTHLKE+-+VORTFATAPNLJSEOP
281- ----SLEEONSHFAF---DTEEIW+AOHSOE--KJQSSF
321- ALKTKETOLSKUPOULBOTLKQFIDGRDKUOEJCFATJLV
361- QAKNFMBB---EJFFEGOB SVOODBJQNPNYBYKQOSDO
401- SJED-----ONRFFNLONAG+H--PLADL+
441- -----++-----
481- ----- -505
    
```

### SEQ ID NO: 11. Secuencia de ADN optimizada por codones YIACC

```

1 ATGAGATTGC AGTTGAGAAC CTGACTAGA AGGTTTTTCT CTATGGCTTC TGGTCTCTCT
61 ACTCCAGATG TTGCTCCATT GGTGATCCA AATATTCATA AGGTTTGGC CTCTCACTT
121 TTCGGTTTGA ACTCTGTTCA TACTGCTAAG CCATCTAAGG TCAAAGAATT TGTGCTCTCT
181 CATGGTGGTC ATACCGTTAT CAACAAAGTT TTGATTGCCA ACAACGGTAT TGCTGCCGTA
241 AAAGAAATTA GGTCTGTTAG AAAATGGGCC TACGAAACTT TTGGTGACGA AAGAGCTATT
301 TCCTTCACTG TTATGGCTAC ACCTGAAGAT TTGGCTGCTA ATGCTGATTA CATTAGAATG
361 GCCGATCAAT ACGTTGAAGT TCCAGTGGT ACAAAACAACA ACAATTACGC TAACGTGAA
421 TTGATCGTTG ATGTCGCTGA AAGATTTGGT GTTGATGCTG TTTGGGCTGG TTGGGTCAT
481 GCTTCTGAAA ATCCATTATT GCCAGAATCT TTGGCTGCTT CTCCAAGAAA GATCGTTTTT
541 ATGGGTCCAC CAGGTGCTGC TATGAGATCA TTGGGTGATA AGATTTCTTC TACCATCGTT
601 GCTCAACATG CTAAGTTCC ATGTATTTCCA TGGTCTGGTA CTGGTGTGA TGAAGTTGT
661 GTTGATAAGT CCACCAACTT GGTTCGGT TCTGAAGAAG TTTACACTAA GGGTTGACT
721 ACTGGTCCAA ACAAGGTTT GGAAAAGGCT AAGCAAATTG GTTCCAGT TATGATTAAG
781 GCTTCTGAAG GTGGTGGTGG TAAAGGTATT AGAAAGGTTG AAAGGGAAGA AGATTCGAA
841 GCTGCTTACC ATCAAGTTGA AGGTGAAATT CCAGGTTCCC CAATTTTCAT TATGCAATTG
901 GCTGGTAACG CCAGACATT GGAAAGTTCAA TTATTGGCTG ATCAGTACGG CAACACATT
961 TCTTTGTTG GTAGAGATT CTCCGTTCAA AGAAGGCATC AAAAGATTAT TGAAGAGCG
1021 CCAGTTACTG TTGCTGGTCA ACAACTTTT ACTGCTATGG AAAAGCTGC CGTCAGATTG
1081 GGTAATTTG TTGGTTATGT TTCTGCCGT ACTGTCGAAT ACTTGACTC TCATGAAGAT
1141 GACAAGTTCT ACTTCTTGA ATTGAACCCA AGATTGCAAG TTGAACATCC AACTACTGAA
1201 ATGGTTACCG GTGTTAATT GCCAGCTGCT CAATTGCAA TTGCTATGGG TATTCCATTG
1261 GACAGAATCA AGGATATTAG GTTGTCTAC GGTGTTAACC CACATACCAC TACTCCAATT
1321 GATTTGATT TCTCTGGTGA AGATGCTGAC AAAACTCAA GAAGGCCAGT TCCAAGAGGT
1381 CATACAAGT CTTGTAGAA TACTTCTGAA GATCCAGGTG AAGGTTTTAA ACCATCTGT
1441 GGTACTATG ACGAATTGAA CTTTAGGTCC TCTTCTAATG TTTGGGTTA CTTCTCTGT
1501 GGTAAATCAAG GTGGTATCCA CTCTTTCT GATTCTCAAT TCGGTCAAT TTTCCGCTT
1561 GGTGAAAACA GATCCGCCCT AAGAAAACAT ATGGTTGTTG CCTTGAAGA ATTGTCATC
1621 AGAGGTGATT TCAGAACCAC TGTGAAATAC TTGATCAAAT TATTGGAAC CCCAGACTC
1681 GAGGATAACA CTATTACTG TGGTTGGTTG GACGAGTTGA TCTCTAACAA ATTGACTGT
1741 GAAAGACCAG ATTCTTCTT GGCTGTTGTT TGTGGTCTG CTACAAAAGC TCATAGAGCT
1801 TCAGAAGATT CTATCGCTAC TTACATGGCT TCTTTGAAA AAGTCAAGT TCCAGCCAGA
1861 GACATTTTGA AACTTTGTT CCCAGTTGAC TTCATCTACG AAGGTCAAAG ATACAGATT
1921 ACCGCTACCA GATCATCCGA AGATTTCTAC ACTTTGTTCA TCAACGGTTC CAGATCGCAT
1981 ATGGGTGTTA GACCATGTGC TGATGGTGGT ATTTTGTGTT TGGTTGGTGG TAGATCCCAT
2041 AACGTTTATT GGAAAAGA AGTTGGCGCT ACCAGATTGT CTGTTGATT TAAAACCTGC
    
```

ES 2 698 500 T3

2101 TTGTTGGAAG TCGAAAACGA TCCAACCTCAA TTGAGATCAC CATCTCCAGG TAAAGTTGGTT  
 2161 AAGTCTTTGG TTGAAAACGG TGATCACGTT AGAGCTAATC AACCATACGC TGAAATCGAA  
 2221 GTCATGAAGA TGACATGAC TTTGACCGCT CAAGAAGATG GTATCGTTCA ATTGATGAAG  
 2281 CAACCAGGTT CTACTATTGA AGCCGGTGAT ATTTTGGGTA TTTTGGCTTT GGATGATCCA  
 2341 TCCAAGGTCA AACATGCTAA ACCATTGAA GGTCAGTTGC CAGAATTGGG TCCACCAACA  
 2401 TTGTCTGGTA ACAAACCACA TCAAAGATAC GAACATTGCC AAAACGCCTT GCACAACATT  
 2461 TTGTTGGGTT TCGATAACCA GGTTGTGATG AAGTCTACAT TGCAAGAAAT GGTCGGTTTG  
 2521 TTGAGAAATC CAGAATTGCC ATACTTGCAA TGGGCTCATC AAGTTTCTTC ATTGCATACA  
 2581 AGAATGTCCG CTAAGTTGGA TGCTACTTTG GCTGGTTTGA TTGATAAGGC TAAACAAAGG  
 2641 GGTGGTGAAT TTCCAGCTAA GCAATTATTG AGAGCCTTGG AAAAAGAAGC TTCATCTGGC  
 2701 GAAGTTGATG CTTTGTTC ACAAACATTG GCCCCTTGT TTGATTTGGC TAGAATAAT  
 2761 CAAGATGGTT TGGCCATCCA TGAATTGCAA GTTGCTGCTG GTTTGTTGCA AGCTTATTAT  
 2821 GATTCTGAAG CTAGATTCTG CGGTCCAAAC GTTAGAGATG AAGATGTTAT CTTGAAGTTG  
 2881 AGGGAAGAAA ACAGGGACTC TTTGAGAAAA GTTGTTATGG CCCAATTGTC CCATTCAAGA  
 2941 GTGGTGGCTA AAAACAAGTT TTTTGGGATG TTGTTGGATG AGTACAAGT TGCTGATCAA  
 3001 GCTGGTACTG ATTCTCCAGC TTCTAATGTT CATGTTGCTA AATACTTGAG GCCAGTCTTG  
 3061 AGAAAGATTG TCGAATTGGA ATCAAGAGCT TCCGCTAAGG TTTCTTTGAA GGCTAGAGAA  
 3121 ATTTTGATCC AATGCGCTTT GCCATCCTTG AAAGAAAGAA CTGATCAATT GGAACACATC  
 3181 TTGAGATCCT CTGTTGTTGA ATCAAGATAC GGTGAAGTTG GTTTGGAAAC TAGAATCCCA  
 3241 AGAGTGCACA TCTTGAAAGA AGTTGTTGAC TCCAAGTACA TCGTGTTCGA TGTTTTGGCT  
 3301 CAATTCTTCG CTCATGATGA TCCAATGATA GTTTTGGCTG CTTTGGAGTT GTATATTAGA  
 3361 AGGGCTTTGA AGGCCTACTC CATTTTGGAT ATTAACTACC ACCAAGACTC TGATTTGCCA  
 3421 CCAGTTATTT CTGAGGATTT CAGATTGCCA ACTATGTCAT CTGCCTTGTA CAACTCTGTT  
 3481 GTTCTTCTCG GTTCTAAGAC TCCAACCTCT CCATCTGTTT CAAGAGCTAT TCTGTTTCC  
 3541 GATTTCTCTT ACACCGTTGA AAGAGATTCT GCTCCAGCTA GAACTGGTGC TATAGTTGCT  
 3601 GTTCCACATT TGGATGATTT GGAAGATGCT TTGACCAGAG TCTTGGAAAA TTTGCCAAAA  
 3661 AGAGGTGCTG GTTTGGCTAT TTCTGTGTTG GCTTCTAACA AATCAGCTGC TGCTTCTGCT  
 3721 AGAGTGCCTG CTGCTGCAGC TGCTTCTTCT GTTGATACTG GTTTGTCTAA CATCTGCAAC  
 3781 GTTATGATCG GTAGAGTTGA TGAATCCGAT GATGATGATA CCTTGATCGC CAGAATTTCC  
 3841 CAAGTTATCG AAGATTTCAA AGAGGACTTC GAAGCTTGCT CCTTGAGAAG AATTACTTTC  
 3901 TCATTCCGGT ACTCCAGAGG TACTTACCCA AAGTACTTTA CTTTTAGAGG TCCAGCCTAT  
 3961 GAAGAAGATC CAACCATTAG ACATATTGAA CCAGCTTGG CTTTTCAATT GGAATTTGGCT  
 4021 AGATTGTCTA ACTTCGACAT CAAGCCAGTT CATACCGATA ACAGAAACAT CCATGTTTAC  
 4081 GAAGCTACTG GTAAGAATGC TGCTTCCGAT AAGAGATTTT TCACCAGAGG TATAGTTAGA  
 4141 CCAGGTAGAT TGAGAGAAAA CATCCCAACA TCCGAGTACT TGATTTCTGA AGCTGATAGA  
 4201 TTGATGTCGG ATATTTGGA TGCCCTGGAA GTTATTGGTA CTACCAACTG TGATTTGAAC  
 4261 CACATCTTCA TTAACCTTCT CGCTGTTTTT GCTTTGAAGC CAGAAGAAGT TGAAGCTGCT  
 4321 TTTGGTGGTT TTTTGGAAAG ATTCGGTAGA AGATTGTGGA GATTGAGAGT TACTGGTGCC  
 4381 GAAATTAGAA TGATGGTTTC TGATCCAGAA ACTGGTTCG CTTTTCCATT GAGAGCTATG  
 4441 ATCAACAACG TTCCCGTTA CGTTGTCCAA TCTGAATTAT ACGTGAAGC CAAGAATGAT  
 4501 AAGGGTCAAT GGATCTTTAA TGCTTGGGT AAACCAGGTT CAATGCATAT GAGATCCATT  
 4561 AACACTCCAT ACCCTACCAA AGAATGGTTG CAACCTAAAA GATACAAGGC CCATTTGATG  
 4621 GGTACTACCT ACTGTTATGA TTTCCAGAG TTGTTCCAGC AGTCCATTGA ATCTGATTGG  
 4681 AAAAAGTACG ATGGTAAGGC TCCAGATGAT TTGATGACTT GCAACGAATT GATCTGGAC  
 4741 GAAGATTCTG GTGAATTGCA AGAAGTTAAT AGAGAACCAG GTGCTAACCA CBTGTTGATG  
 4801 GTTGCTTGGA AATTTGAAGC TAAGACTCCA GAATATCCAA GGGGTAGAAG TTTTATCGTT  
 4861 GTTGCCAACG ATATTACCTT CCAGATTGGT TCTTTTGGTC CAGCTGAAGA TCAATTCTTC  
 4921 TTCAAGTTTA CTGAATTGGC CAGAAAGTTG GGTATTCCAA GAATCTACTT GTCTGTAAAT  
 4981 TCCGGTGCTA GAATTGGTAT TGCTGTGATA TTGGTTCGTA AGTACAAAGT TGCTTGAAT  
 5041 GACGAAACTG ATCCATCTAA GGGTTTCAAG TACTTGTACT TCACTCCAGA ATCATTGGCT  
 5101 ACCTTGAAAC CAGATACTGT TGTTACCACC GAAATTGAAG AAGAAGGTCC AAACGGCGTT  
 5161 GAAAAGAGAC ATGTTATTGA TTACATCGTC GGTGAAAAGG ATGGTTTGGG TGTTGAATGT  
 5221 TTGAGAGGTT CTGGTTAAT TGCTGGTCT ACTTCAAGAG CTTACAAGGA TATTTTCACC  
 5281 TTGACCTTGG TTACCTGTAG ATCAGTTGGT ATTGGTGTCT ACTTGGTTAG ATTGGGTCAA  
 5341 AGAGCCATTC AAATGAAGG TCAGCCAATT ATCTTGACTG GTGCTCCAGC TATTAACAAG  
 5401 TTGTTGGGTA GAGAAGTCTA CTCCTTAAC TTGCAATTGG GTGGTACTCA AATCATGTAC  
 5461 AACACGGTG TTTCTATTG AACCCTAGA GATGATTTGA ACGGTGTTCA TAAGATCATG  
 5521 CAGTGGTTGT CTTATATTCC AGCTTCAAGA GGTTTGCCAG TTCCAGTTTT GCCACATAAG  
 5581 ACTGATGTTT GGGATAGAGA TGTTACCTTC CAACCAGTTA GAGGTGAACA ATATGATGTC  
 5641 AGATGGTTGA TTTCTGGTAG GACTTTGGAA GATGGTGTCT TTGAATCTGG TTTGTTCCGAT  
 5701 AAGGACTTGT TCCAAGAAAC TTTATCTGGT TGGGCTAAGG GTGTTGTTGT TGGTAGAGCT  
 5761 AGATTGGGTG GTATTCCATT TGTTGTTATT GGTGTTGAAA CTGCCACTGT TGATAACACT  
 5821 ACTCCAGCTG ATCCAGCTAA TCCAGATTCT ATTGAAATGT CTACTTCCGA AGCTGGTCAA  
 5881 GTTTGGTATC CAAATTCTGC TTTCAAGACC TCCAAGCCA TTAACGATTT TAATCATGTT  
 5941 GAAGCCTTGC CATTGATGAT TTTGGCTAAT TGGAGAGGTT TTTCCGGTGG TCAAAGAGAT  
 6001 ATGTACAACG AAGTTTTGAA GTACCGCTCC TTTATTGTCG ATGCTTTGGT ATGCTTCAAG  
 6061 CAGCCAATTA TGGTTTACAT TCCACCAACT GGTGAATTGA GAGGTGGTTC TTGGGTTGTT  
 6121 GTTGACCCAA CTATTAACCT CGATATGATG GAAATGTACG CCGATGTTGA AAGTAGAGGT  
 6181 GGTGTTTTGG AACCAGAAGG TATGGTTGGT ATTAAGTACA GAAGAGACAA GTTGTTAGAT  
 6241 ACCATGCCCA GATTAGATCC AGAGTACTCT TCCTTGAAA AACAATTGGA AGAGTCCCCA  
 6301 GACTCCGAAG AATTGAAAGT TAAGTTGTCC GTCAGGGAAA AGTCTTTGAT GCCAATCTAC  
 6361 CAACAAATCT CCGTTCAATT TGCTGACTTG CATGATAGAG CTGGTAGAAT GGAAGCTAAA

# ES 2 698 500 T3

```

6421 GGTGTTATTA GAGAAGCCTT GGTTTGGAAG GATGCTAGAA GATTTTTCTT TTGGAGGATC
6481 AGAAGAAGGT TGGTCGAGGA ATATTTGATC ACCAAGATCA ACTCCATTTT GCCATCTTGT
6541 ACCAGATTGG AATGTTTGGC TAGAATCAAA TCTTGAAGC CAGCTACTTT GGATCAAGGT
6601 TCTGATAGAG GTGTTGCTGA ATGGTTTGAC GAAAATTCTG ATGCTGTTTC TGCCAGGTTG
6661 TCTGAATTGA AAAAAGATGC TTCTGCTCAG TCCTTCGCTT CCCAATTGAG AAAAGATAGA
6721 CAAGGTACAT TGCAGGGTAT GAAGCAAGCT TTGGCTTCTT TGTCTGAAGC TGAAAGAGCT
6781 GAATTATTGA AGGGCTTGTA A
    
```

## SEQ ID NO: 12. Plásmido basado en el estudio del promotor

```

1   tcgcgcgctt  cggatgatgac  ggtgaaaacc  tctgacacat  gcagctcccg  gagacggtca
61  cagcttgtct  gtaagcggat  gccgggagca  gacaagcccg  tcagggcgcg  tcagcgggtg
121 ttggcgtgtg  tcggggctgg  cttaaactatg  cggcatcaga  gcagattgta  ctgagagctg
181 accacgcttt  tcaatccaat  tcatcatttt  ttttttattc  ttttttttga  tttcgggttc
241 tttgaaattt  ttttgattcg  gtaatctccg  aacagaagga  agaacgaagg  aaggagcaca
301 gacttagatt  ggtatatata  cgcataatgta  gtgttgaaga  aacatgaaat  tgcccagtat
361 tcttaacceca  actgcacaga  acaaaaacct  gcaggaaacg  aagataaatc  atgtcgaaag
421 ctacatataa  ggaacgtgct  gctactcadc  ctagtccctg  tgctgccaag  ctatthaata
481 tcatgcacga  aaagcaaaaa  aacttgtgtg  cttcattgga  tghtcgtacc  accaaggaa
541 tactggagtt  agttgaagca  ttaggtccca  aaatttgttt  actaaaaaca  catgtggata
601 tcttgactga  tttttccatg  gaggggcacag  ttaagccgct  aaaggcatta  tccgccaaat
661 acaatttttt  actcttcgaa  gacagaaaat  ttgctgacat  tggtaataca  gtcaaatg
721 aagtgacgca  ggggtatatac  agaatagcag  aatgggcaga  cttaccgaat  gcacacggtg
781 tgggtggccc  aggtattggt  agcgggttga  agcaggcgcg  agaagaagta  acaaggaa
841 ctagaggcct  tttgatgtta  gcgaattgt  catgcaaggg  ctccctatct  actggagaat
901 aaggagaaaa  tactgttgac  attgcaaga  gcgacaaaaga  ttttgtatc  gctttattg
961 ctcaaagaga  catgggtgga  agagatgaag  gttacgattg  gttgattatg  acaccgggtg
1021 tgggtttaga  tgacaagggg  gacgcattgg  gtcaacagta  tagaaccgtg  gatgatgtg
1081 tctctacagg  atctgacatt  attattgttg  gaagaggact  atttgcaaa  ggaagggatg
1141 ctaaggtaga  ggggtgaact  tacagaaaag  caggctggga  agcataattg  agaagatg
1201 gccagcaaaa  ctaaaaaact  gtattataag  taaatgcatt  tataactaac  tcacaaat
1261 gagcttcaat  ttaattatat  cagttattac  cctgcccgtg  gaaataccgc  acagatgctg
1321 aagtgacaaa  taccgcatca  ggaattgta  aacgttaata  ttttgttaa  attcgcgta
1381 aatttttgtt  aatcagctc  attttttaac  caataggccg  aatcggcaa  aatccctat
1441 aatcaaaaag  aatgaccgga  gatagggttg  agtgttgttc  cagtttggaa  caagagtcca
1501 ctattaaaga  acgtggactc  caactgcaaa  gggcgaaaaa  cctctatca  gggcgatgg
1561 ccaactacgtg  aaccatcacc  ctaatcaagt  tttttggggt  cgagggtcgg  taagacta
1621 aatcggaacc  ctaaaaggag  cccccgattt  agaacttgac  ggggaaagcc  gggcgaactg
1681 gcgagaaagg  aaggaagaa  agcgaagaa  gcgggcgcta  gggcgctggc  aagtgtagc
1741 ctacagctgc  gcgtaacac  cacaccgccc  gcgttaatg  gcgcgctaca  gggcgctcg
1801 cgccattcgc  cattcaggct  gcgcaactgt  tgggaagggc  gatcgggtcg  ggccctctcg
1861 ctattacgcc  agctggcgaa  ggggggatgt  gctgcaaggg  gattaagttg  ggtaacgcca
1921 gggttttccc  agtcacgacg  ttgtaaacg  acggccagtg  aattgtaata  cgactacta
1981 tagggcgaa  tggagctcca  ccgcccgtgc  ggccgatag  gccactagtg  gatctgat
2041 catcgatgaa  ttcgagctcg  ttttcgacac  tggatggcgg  cgttagtatc  gaatcgacag
2101 cagttatagc  accagcattc  acatacgtat  gacgcatgat  attactttct  cgccactaa
2161 cttcgcactc  gggcagatga  tgtcagggcg  aaaaaaaata  taaatcacgc  taacatttga
2221 ttaaaaataga  acaactacaa  tataaaaaaa  ctatacaaat  gacaagttct  tgaaaaacaag
2281 aatcttttta  ttgtcagtac  tgattattcc  tttgccctcg  gacgagtgct  ggggctcgg
2341 tttccactat  cggcgagtac  ttctacacag  ccactcggtcc  agacggccgc  gcttctcgg
2401 gcgattttgtg  tacgcccgac  agtcccggct  ccggtatcgg  cgattgctgc  gatcgacc
2461 tgcgcccagg  ctgcatcadc  gaaattgccc  tcaaccaagc  tctgatagag  ttggtcaaga
2521 ccaatcgga  gcataacgc  ccgagccgc  ggcgatcctg  caagctccgg  atgctccgc
2581 tcgaagtagc  gcgtctgctg  ctccatacaa  gcccaaccag  gcctccagaa  gaagatgtt
2641 gcgacctcgt  attgggaatc  cccgaacatc  gcctcgctcc  agtcaatgac  cgctgttatg
2701 cggccattgt  ccgtcaggac  attgttgag  ccgaaatccg  cgtgcacgag  gtgcccgatg
2761 tccggggcag  cctcggccca  aagcatcagc  tcatcgagag  cctgcccagc  ggacgactg
2821 acggtgtcgt  ccatcacagt  ttgccagtga  tacacatggg  gatcagcaat  cgcgcatatg
2881 aatcacgcc  atgtagtgt  ttgaccgat  cettgcccgtc  cgaatgggc  gaaccgctc
2941 gtctggctaa  gatcggccgc  agcagatcga  tccatggcct  ccgacaccgg  ctgcagaaca
3001 gcgggcagtt  cggtttcagg  caggctctgc  aacgtgacac  cctgtgcacg  gcgggagatg
3061 caataggtca  ggtctcgcgt  gaattcccca  atgtcaagca  cttccggaat  cgggagcgcg
3121 cccgatgcaa  agtgccgata  aacataacga  tctttgtaga  aacctcggc  gcagctattt
3181 acccgcagga  catatccacg  ccctcctaca  tcgaagctga  aagcacgaga  ttcttcgccc
3241 tccgagagct  gcatcaggtc  ggagacgctg  tcgaactttt  cgatcagaaa  cttctcgaca
3301 gacgtcgcgg  tgagttcagg  ctttttacc  atggttgttt  atgttcggat  gtgatgtgag
3361 aactgtatcc  tagcaagatt  ttaaaaggaa  gtatatgaaa  gaagaacctc  agtggcaaat
3421 cctaaccctt  tatatttctc  tacagggcgg  cggcgtgggg  acaattcaac  cgtctgtga
3481 ggggagcgtt  tccctgctcg  caggtctgca  gcgaggagcc  gtaatttttg  cttcgcgccc
3541 tccggccatc  aaaatgtatg  gatgcaaatg  attatacatg  gggatgtatg  gctcaaatg
3601 acgggacgca  gtcacatcat  gccctgagc  tgcgcacgct  aagactgtca  aggaggtat
3661 tctgggcctc  catgtcgtg  gccgggtgac  ccggcgggga  cGaggcaagc  taacagatc
3721 tCCCGGGtAG  TTTaaacaAT  GAATGTACC  TTTGAAGAAA  GAGCCAGTTT  ACACGGTTAC
    
```

ES 2 698 500 T3

3781 AGAATCGGTA TCGCATCCTT AGACGCCCCA GCATCCTTGA ACGCTTTGTC CTTACCAATG  
 3841 ATTGATGCTT TACAAGACAG ATTGAGAGCT TGGGCAGAAG ATGCAGACAT AGCCTGTGTC  
 3901 TTGTTACGTG GTAATGGTTC TAAAGCATT TCGCGAGGTG GTGACGTTGT CCAATTAGCT  
 3961 AAGAAATGTT TGGCCTCCCC AGGTGAAGCC CCTGAATTGG CTGAAAGATT TTTGCTAGA  
 4021 AGTTACAGAT TAGATCATT TTTGCACACA TACCCAAAGC CTTTGATATG CTGGGCTCAT  
 4081 GGTACAGTTT TAGGTGGTGG TATGGGTTTG TTACAAGGTG CTGGTATTAG AATAGTCACC  
 4141 CCATCTTCAA GATTGGCAAT GCCTGAAATC TCTATTGGTT TATTTCCAGA TGTGGTGGT  
 4201 TCCCATTTCT TAAGTAGATT GCCTGGTAAA TTGGGTTTAT TTTTCGGTTT AACCCGTTCA  
 4261 CCATTGAATG CCAGAGATGC TTTGGACTTA AACTTGGCTG ATAGATTCTT GTTAGATACT  
 4321 CAACAAGACG CATTGATCGA TGGTTTGATC CAATTGAACT GGAGAGAACA ACCAGATTTG  
 4381 CAATTGCATT CCTTGTTAAA GGCTTTAGAA CAACAAGCAA GAAGTGAATT ACCAGCTGCA  
 4441 CAATGGTTGC CTAGAAGAGA AAGATTAGAC GCCTTGTTAG ATCAAGCTAC TTACCATTG  
 4501 TCTTGGCAAG CCTTAGCTTC ATTGGAAAAC GATGAAGACG CATTGTTAGC CAAAGCCGCT  
 4561 AAGACTATGT TGGGTGGTTC ACCTTTAACA GGTCAATTTG TCTGGGGTCA AATAGAAAGA  
 4621 GCTAGACACT TATCTTTGGC ACAAGTATT CAAATGGAAT ACGGCATGTC ATTGAATTGT  
 4681 TCCAGACATC CAGAATTTGC AGAAGGTGTA AGAGCCAGAT TAATCGATAA AGACCAGCT  
 4741 CCACATTGGC ACTGGCCTGA CGTAAACCAA GTTCTGAAG CCGTTATTGC AGCCCATTTT  
 4801 GCACCATTAG ATGACCACCC TTTAGCTGAT TTGGCATAAG tttAAACtca tgt aattagt  
 4861 tatgtcacgc ttacattcac gccctcccc cacatccgct ctaaccgaaa aggaaggagt  
 4921 tagacaacct gaagtctagg tccctattta tttttttata gttatgttta tattaagaac  
 4981 gttatttata tttcaattt tcttttttt tctgtacaga cgcgtgtacg catgtaacat  
 5041 tatactgaaa accttgcttg agaaggtttt gggacgctcg aaggctttaa tttgcgctc  
 5101 ctacgagctt ttgttccct tagtgagggt taattTcgag cttggcgtaa tcatggctat  
 5161 agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata ggagccggaa  
 5221 gcataaaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgaggta actcacatta attgctgtgc  
 5281 gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc  
 5341 aacgcgcggg gagagcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact  
 5401 cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcyggcag cgglatcagc tcaactcaaa ggcgtaaac  
 5461 ggttatccac agaatcaggg gcaaacgag gaaagaacat gtgagcaaaa gtcagcaaaa  
 5521 aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgTTTT ccataggctc ggccccctg  
 5581 acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa  
 5641 gataccaggc gttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgtttccg acctgccc  
 5701 ttaccgata cctgtccgcc tttctccct cgggaagcgt ggcgctttc caatgctcac  
 5761 gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac  
 5821 cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta tcgctctgag tccaaccg  
 5881 taagacacga cttatcgcca ttggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt  
 5941 agttagccgg tgctacagag tctttgagc ggtggcctaa ctacggctca actagaaggga  
 6001 cagtatTTgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct  
 6061 cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga  
 6121 ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg ggtctgacg  
 6181 ctaggggaa cgaaaactca cgtaaaggga ttttggctat ttttggctat aaaaagatct  
 6241 tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt  
 6301 aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc  
 6361 tatttcgttc atccatagtt gcctgactgc ccgctcgtgta gataactacg atacgggagg  
 6421 gcttaccatc tggccccagt cctgcaatga taccgcgaga cccacgctca cggctccag  
 6481 atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt  
 6541 tatccgctc catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcggcag  
 6601 ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgctcgtcgt  
 6661 ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca  
 6721 tgttgtaaaa aaaagcgtt tctctcctcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagtgg  
 6781 ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat  
 6841 ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgta  
 6901 tgccggcacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca  
 6961 gtaactttaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct  
 7021 taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat  
 7081 cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa  
 7141 agggaataag ggcgacacgg aaatgTTgaa tactcatact cttccttttt caatattatt  
 7201 gaagcattta tcagggttat tgtctcatga cgggatacat atttgaatgt atttagaaaa  
 7261 ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctggg tccttttcat  
 7321 cacgtgctat aaaaataatt ataattttaa ttttttaata taaatatata aattaaaaat  
 7381 agaaagtaaa aaaagaaatt aaagaaaaaa tagtttttgt tttccgaaga tgtaaaagac  
 7441 tctaggggga tcgccaacaa ataactactt ttatcttgcct cttcctgctc taaggatta  
 7501 atgccgaatt gtttcatctt gtctgtgtag aagaccacac acgaaaaatc tgtgatttta  
 7561 cattttactt atcgttaatc gaatgtatat ctattttaatc tgcttttctt gtctaataaa  
 7621 tatatatgta aagtacgctt tttgttgaac ttttttaaac ctttgtttat tttttttct  
 7681 tctattcgta actcttctac cttctttatt tactttctaa aatccaaata caaacataa  
 7741 aaataaataa acacagagta aattcccaaa ttattccatc attaaaagat acgagggcgcg  
 7801 tgtaagttac aggcaagcga tccgtcctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat  
 7861 aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt c //

ES 2 698 500 T3

**SEQ ID NO: 13.** Cebador A93

CCAATATATAATAAAATATGGAGGAATGCGATGCTCAGAAATACGCTAAAATGTGCCCAA

**SEQ ID NO: 14.** Cebador A94

TGCCTGGAGATCCTTACTCGAGTTGGATCCTTATTTCCATCTTAAGCCATCGTAACTTC

5 **SEQ ID NO: 15.** Cebador A95

TTTTACTGATGCGTATTCTTTGAATTTTCAAATAGCA

**SEQ ID NO: 16.** Cebador A96

TCAAAGAATACGCATCAGTAAAAAATTTGATGGA

**SEQ ID NO:17.** Cebador A97

10 TTTTACTGATGTTTATTCTTTGAATTTTCAAATAGCAACTT

**SEQ ID NO: 18.** Cebador A98

TCAAAGAATAAACATCAGTAAAAAATTTGATGGACTTGG

**SEQ ID NO: 19.** Cebador A99

TTTTACTGATTCTGATTCTTTGAATTTTCAAATAGCAAC

15 **SEQ ID NO: 20.** Cebador A100

TCAAAGAATACGAATCAGTAAAAAATTTGATGGACT

**SEQ ID NO: 21.** Cebador A120

CCAATATATAATAAAATATGGAGGAATGCGATGTCTACAACACATAACGTCCCTC

**SEQ ID NO: 22.** Cebador A121

20 TGCCTGGAGATCCTTACTCGAGTTGGATCCTTACTCAACAGGTAAGGCGCGAG

**SEQ ID NO: 23.** Cebador Y1-11 A13-R

CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGTTATTTCCATCTTAAGCCATCGTAACTTC

**SEQ ID NO: 24.** Cebador Y1-11\_A13-F

CATTAGAAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAAACAATGACTACTCAACCCCAGCTAAATG

25 **SEQ ID NO: 25.** Cebador YO012

GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAAACAATGACCGAACAAGTCTTATTCTCAGTA

**SEQ ID NO: 26.** Cebador YO013

CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGTTAAGCGTTCAACAAATTGAAAAATCTG

**SEQ ID NO: 27.** Cebador YO014

30 GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAAACAATGACCGAACATGTATTATTCTCAG

**SEQ ID NO: 28.** Cebador YO015

CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGTTAAGCGTTTAAACAAATTGAAAAATC

**SEQ ID NO: 29.** Cebador YO018

GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAAACAATGAGAAGATACATCAGAGGTGGT

## ES 2 698 500 T3

**SEQ ID NO: 30.** Cebador YO019

CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGTTATGCAGCGTTCAACAAATTGAAAA

**SEQ ID NO: 31.** Cebador YO020

GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAAACAATGACCGAACAAGTCTTATTCTCAG

5 **SEQ ID NO: 32.** Cebador YO021

CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGTTAAGCGTTCAACAAATTGAAAAATCT

**SEQ ID NO: 33.** Cebador YO024

GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAAACAATGAACTTACAATTTGAAGAAAGACCA

**SEQ ID NO: 34.** Cebador YO025

10

CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGTTACAAATCAGCTAAAGGGTGTTTAC

**SEQ ID NO: 35.** Cebador YO026

GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAAACAATGAACTTACACTTTGAAGAATTGAC

**SEQ ID NO: 36.** Cebador YO027

CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGTTAGTAGTCAGACAAATCTGCTAAAG

15

**SEQ ID NO: 37.** Cebador YO028

GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAAACAATGACAATCCACTGTGAAGTATTAAC

**SEQ ID NO: 38.** Cebador YO029

CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGTTAACCAACGTCAGCCAAAGGGTG

**SEQ ID NO: 39.** Cebador YO030

20

GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAAACAATGAATGTCACCTTTGAAGAAAGAG

**SEQ ID NO: 40.** Cebador YO031

CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGTTATGCCAAATCAGCTAAAGGGTG

**SEQ ID NO: 41.** Fragmento de recombinación lineal para la integración genómica de F6AA82-2 en el sitio YPRCdelta15 de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*

ES 2 698 500 T3

1 CGAAACCCCTA TGCTCTGTTG TTCGGATTG AAATTTTAAA ACTACATTA TGTGTTAGTT  
 61 TTTCTTTCTT TCTTTCTTTG TCTTGACGTG ATTTGGACTT CTGTCTTGCA TTCGCGTCCA  
 121 TTCATCTGAC CCAATATTCC TTTTGGTTTT GTTATCCTTA TAAAAAGAAA GGAAGCTTCT  
 181 TAGAGGGAAA AAAATGATGA AGAGTAATGC CAAAATATAA ATAAATAAAT AAATATGAAA  
 241 ATCATTITCT ATTTTAAATA GAATAAGAAG AGCATCTTAA GATTACAATT TCAAGAAATA  
 301 GTTTACACAG TATATCCAAT AACTCCAATA AACTACTTTC CTATACAAAT TTCTATGGTG  
 361 GGATTAATAG TAAAACCTCT GTACTTCTCT AATTCACCAA GAAATTAAGG TAAACATCTG  
 421 GTAAGCACTA TCCAGCTTTT TGCTATTACA CATATGGCTT TTCTGCAATC ATTTCTTCCC  
 481 ATTTTGTCTC AAGCCGTTAG TCTTGAAACC ACAGGCGGAG TAGAGTTACT TGATGCGGTA  
 541 TTTTACATGC CTTTTTTCAC TGCAAAAAAA ATGAAAATACA TATTTACACG ATTTGCAGGA  
 601 CAGTTTACGA TAGTGAGTAT GCAGAATAGT TAACACCTTT GTTTTATCCT TTTGTGTCTT  
 661 AATTATATGA TATAAAGGCG CCTGGCAAAT TCCCCTTTTA AGAGCTTGGT GAGCGCTAGG  
 721 AGTCACTGCC AGGTATCGTT TGAACACGGC ATTAGTCAGG GAAGTCATAA CACAGTCCTT  
 781 TCCCAGCAAT TTCTTTTTCT ATTACTCTTG GCCTCCTCTA GTACACTCTA TATTTTTTTA  
 841 TGCCTCGGTA ATGATTTTCA TTTTTTTTTT TCCCCTAGCG GATGACTCTT TTTTTTCTT  
 901 AGCGATTGGC ATTATCACAT AATGAATTAT ACATTATATA AAGTAATGTG ATTTCTTCGA  
 961 AGAATATACT AAAAAATGAG CAGGCAAGAT AAACGAAGGC AAAGATGACA GAGCAGAAAG  
 1021 CCCTAGTAAA GCGTATTACA AATGAAACCA AGATTCAGAT TGCGATCTCT TTAAGGGGTG  
 1081 GTCCCCTAGC GATAGAGCAC TCGATCTTCC CAGAAAAAGA GGCAGAAGCA GTAGCAGAAC  
 1141 AGGCCACACA ATCGCAAGTG ATTAACGTCC ACACAGGTAT AGGGTTTCTG GACCATATGA  
 1201 TACATGCTCT GGCCAAGCAT TCCGGCTGGT CGCTAATCGT TGAGTGCATT GGTGACTTAC  
 1261 ACATAGACGA CCATCACACC ACTGAAGACT GCGGGATTGC TCTCGTCAA GCTTTTTAAG  
 1321 AGGCCCTACT GCGCGTGGA GTAAAAAGGT TTGGATCAGG ATTTGCGCCT TTGGATGAGG  
 1381 CACTTTCCAG AGCGGTGGTA GATCTTTCGA ACAGGCCGTA CGCAGTTGTC GAACCTGGTT  
 1441 TGCAAAGGGA GAAAGTAGGA GATCTCTCTT GCGAGATGAT CCCGCATTTT CTTGAAAGCT  
 1501 TTGCAGAGGC TAGCAGAATT ACCCTCCACG TTGATTGTCT GCGAGGCAAG AATGATCATC  
 1561 ACCGTAGTGA GAGTGCCTT AAGGCTCTTG CGGTTGCCAT AAGAGAAGCC ACCTCGCCCA  
 1621 ATGGTACCAA CGATGTTCCC TCCACCAAAG GTGTTCTTAT GTAGTGACAC CGATTATTTA  
 1681 AAGCTGCAGC ATACGATATA TATACATGTG TATATATGTA TACCTATGAA TGTCAGTAAG  
 1741 TATGTATACG AACAGTATGA TACTGAAGAT GACAAGGTAA TGATCATTC TATACGTGTC  
 1801 ATTCTGAACG AGGCGCGCTT TCCTTTTTTC TTTTGTCTTT TTCTTTTTTT TTCTCTTGAA  
 1861 CTCGACGGAT CTATGCGGTG TGAAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC  
 1921 AGGAAATTGT AAACGTTAAT ATTTTGTATA AATTCGCGTT AAATTTTTGT TAAATCAGCT  
 1981 CATTTTTTAA CCAATAGGCC GATAGCTTCA AAATGTTTCT ACTCCTTTTT TACTCTTCCA  
 2041 GATTTTCTCG GACTCCGCGC ATCGCCGTAC CACTTCAAAA CACCCAAGCA CAGCATACTA

ES 2 698 500 T3

2101 AATTTCCCTT CTTTCTTCTT CTAGGGTGTG GTTAATTACC CGTACTAAAG GTTTGAAAA  
 2161 GAAAAAAGAG ACCGCCTCGT TTCTTTTTCT TCGTCGAAAA AGGCAATAAA AATTTTTTATC  
 2221 ACGTTTCTTT TTCTTGAAAA TTTTTTTTTT GATTTTTTTC TCTTTCGATG ACCTCCCAT  
 2281 GATATTTAAG TTAATAAACG GTCTTCAATT TCTCAAGTTT CAGTTTCATT TTTCTGTTC  
 2341 TATTACAAC TTTTTTACTT CTGCTCATT AGAAAGAAAG CATAGCAATC TAATCTAAGT  
 2401 TAAAAACAAT GAATGTCACC TTTGAAGAAA GAGCCAGTTT ACACGGTTAC AGAATCGGTA  
 2461 TCGCATCCTT AGACGCCCCA GCATCCTTGA ACGCTTTGTC CTTACCAATG ATTGATGCTT  
 2521 TACAAGACAG ATTGAGAGCT TGGGCAGAAG ATGCAGACAT AGCCTGTGTC TTGTTACGTG  
 2581 GTAATGGTTC TAAAGCATT TCGCGAGGTG GTGACGTTT CCAATTAGT AAGAAATGTT  
 2641 TGGCCTCCCC AAGTGAAGCC CCTGAATTGG CCTGAATTAG CTGAAAGATT TTTTCGTAGA AGTTACAGAT  
 2701 TAGATCATT TTTGCACACA TACCCAAAGC CTTTGATATG CTGGGCTCAT GGTACGTTT  
 2761 TAGGTGGTGG TATGGGTTTG TTACAAGGTG CTGGTATTAG AATAGTCACC CCATCTCAA  
 2821 GATTGGCAAT GCCTGAAATC TCTATTGGTT TATTTCCAGA TGTGGTGGT TCCCATTCT  
 2881 TAAGTAGATT GCCTGGTAAA TTGGGTTTAT TTTTCGGTTT AACCGCTTCA CCATTGAATG  
 2941 CCAGAGATGC TTTGGACTTA AACTTGGCTG ATAGATTCTT GTTAGATACT CAACAAGACG  
 3001 CATTGATCGA TGGTTTGATC CAATTGAACT GGAGAGAACA ACCAGATTG CAATTGCATT  
 3061 CCTTGTTAAA GGCTTTAGAA CAACAAGCAA GAAGTGAATT ACCAGCTGCA CAATGGTTGC  
 3121 CAGAATTTGC AAGATTAGAC GCCTTGTAG ATCAAGCTAC TTTACCATTG CTTTGGCAAG  
 3181 CCTTAGCTTC ATTGGA AAC GATGAAGACG CATTGTTAGC CAAAGCCGCT AAGACTATGT  
 3241 TGGGTGGTTC ACCTTTAACA GGTCAATTTGG TCTGGGGTCA AATTAGAAGA GCTAGACACT  
 3301 TATCTTTGGC ACAAGTATTT CAAATGGAAT ACGGCATGTC ATTGAATTGT TGCAGACATC  
 3361 CAGAATTTGC AGAAGGTGTA AGAGCCAGAT TAATCGATAA AGACCACGCT CCACATTGGC  
 3421 ACTGGCCTGA CGTAAACCAA GTTCTGAAG CCGTTATTGC AGCCCATTTT GCACCATTAG  
 3481 ATGACCACCC TTTAGCTGAT TTGGCATAAC GATACCGTCG ACCTCGAGTC ATGTAATTAG  
 3541 TTATGTCACG CTTACATTCA CGCCCTCCCC CCACATCCGC TCTAACCGAA AAGGAAGGAG  
 3601 TTAGACAACC TGAAGTCTAG GTCCCTATTT ATTTTTTAT AGTTATGTTA GTATTAGAA  
 3661 CGTTATTTAT ATTTCAAATT TTTCTTTTTT TTCTGTACAG ACGCGTGTAC GCATGTAACA  
 3721 TTATACTGAA AACCTTGCTT GAGAAGGTTT TGGGACGCTC GAAGGCTTTA ATTTGCGGCC  
 3781 ATAAAGCAGC CGCTACCAA CAGACAAGAT TCAGTATGTA AGGTAAATAC CTTTTGCAC  
 3841 AGTTAAACTA CCCAACTTA TTAAGCTTG ATAAATTAAT GAAATCCAC CTTTCACTTA  
 3901 GATTCAGGCC TCATATAGAT TAGATATAGG GTACGTAACA TTCTGTCAAC CAAGTTGTTG  
 3961 GAATGAAAGT CTAAAATGTC ATCTATTCGG TAGCACTCAT GTTACTAGTA TACTGTCACA  
 4021 TGCGGTGTAA CGTGGGGACA TAAAACAGAC ATCAAATATA ATGGGAGCTG AAATGCAAG  
 4081 ATCGATAATG TAATAGGAAT GAAACATATA AAACGAAAGT AGAAGTAATG GTAATATTAG  
 4141 TATGTAGAAA TACCGATTCA ATTTTGGGGA TTCTTATATT CTCGAGAGAA TTTCTGTAT  
 4201 AATCTGTATA CATAATATTA TAGGCTTTAC CAACAATGGA ATTTGACAA TTATCATATT  
 4261 ATTCACCAAT TAATCACAAG TTGGTAATGA GTTTGATAAC AAGTTACTTT CTTAACACCG  
 4321 TTAGTATCGT CAAAACACTC GGTTTTACTC GAGCTTGTAG CACAATAATA CCGTGTAGAG  
 4381 TTCTGTATTG TTCTTCTTAG TGCTTGTATA TGCTCATCCC GACCTTCCAT T

**SEQ ID NO: 42.** Fragmento de recombinación lineal para la integración genómica de F6AA82-2 en el sitio YORWdelta22 de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*

1 ACCGGAGCTT GGATATGATA AACGAAATAT TCTTGAATCG TGAGATCGCC TGTTTTCAA  
 61 ACCGTTGGAG GCAGAAACAA TTTTGTACACA AGATGGGCAT TCTACCCCAT CCTTGCTGTA  
 121 TTATTGTAGT CTCGCTTTCT TTTATGCTGG ACAAATGAGA CTACTGCACA TTTTATACG  
 181 TTCTTGGTTT TTTTAAAGG TGTGGTTTCG GCATTATCCT GCCGCACGTT TCTTGGATA  
 241 TTCATCTGTA TTCTCTATTT TAAACGCTTC AGCCTATCAG GATTTGGTTT TGATACATAC  
 301 TGCAAGAGTG TATCTCGGGA ACAGTCATTT ATTCGCAAC AAACCTAAT CCGGACCGCG  
 361 TTAGGCGATT TCTAGCATAT ATCAAATACC GTTCGCGATT TCTTCTGGGT TCGTCTCTTT  
 421 TCTTTTAAAT ACTTATTAAC GACTCAAAAC AACTACACTT CGTTGTATCT CAGAATGAGA  
 481 TCCCTCAGTA TGACAATACA TCATTCTAAA CGTTCGTAAA ACACATATGA AACAACTTTA  
 541 TAACAAAGCG AACAAAATGG GCAACATGAG ATGAAACTCC GCGTCCCTTA GCTGAACACT  
 601 CCAAACGTAC GAATGCCTGA ACAATTAGTT TAGATCCGAG ATTCGCGCT TCCATCATT  
 661 AGTATAATCC ATATTTTATA TAATATATAG GATAAGTAAC AGCCCGCGAA TCGAGGAGAA  
 721 CTTCTAGTAT ATCCACATAC CTAATATTA TGCCTTATTA AAAATGGAAAT CCAACAATT  
 781 ACATCAAAAT CCACATTCTC TTCAAAATCA ATTGTCTGT ACTTCTTGT TCAATGTTGT  
 841 TCAAAAACGT TATATTTATA GGATAATTAT ACTCTATTT TCAACAAGTA ATTGGTTGTT  
 901 TGGCCGAGCG GTCTAAGGCG CCTGATTCAA GAAATATCTT GACCGCAGTT AACTGTGGGA  
 961 ATACTCAGT ATCGTAAGAT GCAAGAGTTC GAATCTCTTA GCAACCATTA TTTTTTTCT  
 1021 CAACATAACG AGAACACACA GGGGCGCTAT CGCACAGAAT CAAATTCGAT GACTGGAAT  
 1081 TTTTGTAA TTTTCAAGGT CGCCTGACGC ATATACCTTT TTCAACTGAA AAATGGGAG  
 1141 AAAAAGGAAA GGTGAGAGGC CGGAACCGGC TTTTATATA GAATAGAGAA GCGTTCATGA  
 1201 CTAAATGCTT GCATCACAAT ACTTGAAGTT GACAATATTA TTTAAGGACC TATTGTTTT  
 1261 TCCAATAGTT GGTAGCAAT CGTCTACTT TCTAACTTT CTTACCTTT ACATTTTCAGC  
 1321 AATATATATA TATATTTCAA GGATATACCA TTCTAATGTC TGCCCTATG TCTGCCCTA  
 1381 AGAAGATCGT CGTTTTGCCA GGTGACCACG TTGGTCAAGA AATCACAGCC GAAGCCATTA  
 1441 AGGTTCTTAA AGCTATTTCT GATGTCGTT CCAATGTCAA GTTCGATTT GAAAATCATT  
 1501 TAATTTGGTGG TGCTGCTATC GATGCTACAG GTGTCCACT TCCAGATGAG GCGCTGGAAG  
 1561 CCTCCAAGAA GGTGATGCC GTTTGTAGG GTGCTGTGGC TGTCCTTAA TGGGGTACCG  
 1621 GTAGTGTAG ACCTGAACAA GGTTTACTAA AAATCCGTAA AGAACTCAA TTGTACGCCA  
 1681 ACTTAAGACC ATGTAACCTT GCATCCGACT CTCTTTTAGA CTTATCTCCA ATCAAGCCAC  
 1741 AATTTGCTAA AGGTACTGAC TTCGTTGTTG TCAGAGAATT AGTGGGAGGT ATTTACTTTG

ES 2 698 500 T3

1801 GTAAGAGAAA GGAAGACGAT GGTGATGGTG TCGCTTGGGA TAGTGAACAA TACACCGTTC  
1861 CAGAAGTGCA AAGAATCACA AGAATGGCCG CTTTCATGGC CCTACAACAT GAGCCACCAT  
1921 TGCCTATTTG GTCCTTGGAT AAAGCTAATC TTTTGGCCTC TTCAAGATTA TGGAGAAAAA  
1981 CTGTGGAGGA AACCATCAAG AACGAATTCC CTACATTGAA GGTTC AACAT CAATTGATTG  
2041 ATTCGTCCGC CATGATCCTA GTTAAGAACC CAACCCACCT AAATGGTATT ATAATCACCA  
2101 GCAACATGTT TGGTGATATC ATCTCCGATG AAGCCTCCGT TATCCCAGGT TCCTTGGGTT  
2161 TGTTGCCATC TGCGTCCTTG GCCTCTTTGC CAGACAAGAA CACCCGATTT GGTTTGTACG  
2221 AACCATGCCA CGGTTCTGCT CCAGATTTGC CAAAGAATAA GGTGACCCCT ATCGCCACTA  
2281 TCTTGTCTGC TGCAATGATG TTGAAATGTG CATTGAACTT GCCTGAAGAA GGTAAGGCCA  
2341 TTGAAGATGC AGTTAAAAAG GTTTTGGATG CAGGTATCAG AACTGGTGAT TTAGGTGGTT  
2401 CCAACAGTAC CACCGAAGTC GGTGATGCTG TCGCCGAAGA AGTTAAGAAA ATCCTTGTCTT  
2461 AAAAAGATTC TCTTTTTTTA TGATATTTGT ACATAAACTT TATAAATGAA ATTCTAATAA  
2521 GAAACGACAC GAAATTACAA AATGGAATAT GTTCATAGGG TAGACGAAAC TATATACGCA  
2581 ATCTACATAC ATTTATCAAG AAGGAGAAAA AGGAGGATAG TAAAGGAATA CAGTAAGCA  
2641 AATTGATACT AATGGCTCAA CGTGATAAGG AAAAAAGAATT GCACTTTAAC ATTAATATTG  
2701 ACAAGGAGGA GGGCACCACA CAAAAAGTTA GGTGTAACAG AAAATCATGA AACTACGATT  
2761 CCTAATTTGA TATTGGAGGA TTTTCTCTAA AAAAAAAAAA ATACAACAAA TAAAAAACAC  
2821 CCTAATGACCT GACCATTTGA TGGAGTTTAA GTC AATACCT TCTTGAAGCA TTCCCATAAA  
2881 TGGTGAAAGT TCCCTCAAGA ATTTTACTCT GTCAGAAACG GCCTATAGCT TCAAAATGTT  
2941 TCTACTCCTT TTTTACTCTT CCAGATTTTC TCGGACTCCG CGCATCGCCG TACCACTTCA  
3001 AAACACCCAA GCACAGCATA CTA AATTTCC CCTCTTTCTT CCTCTAGGGT GTCGTTAATT  
3061 ACCCGTACTA AAGGTTTGGG AAAGAAAAAA GAGACCGCCT CGTTTCTTTT TCTTCGTCGA  
3121 AAAAGGCAAT AAAAAATTTT ATCACGTTTT TTTTCTTTGA AAATTTTTTT TTTGATTTTT  
3181 TTCTCTTTTC ATGACCTCCC ATTGATATTT AAGTTAATAA ACGGTCTTCA ATTTCTCAAG  
3241 TTTCAGTTTC ATTTTTCTTG TTCTATTACA ACTTTTTTTA CTCTTGTCTC ATTAGAAAAG  
3301 AAGCATAGCA ATCTAATCTA AGTTTAAAAA AATGAATGTC ACCTTTGAAG AAAGAGCCAG  
3361 TTACACGGT TACAGAATCG TACAGCATC CTTAGACGCC CTTAGACGCC CCAGCATCTT TGAACTGGTT  
3421 GTCCTTACCA ATGATTGATG CTTTACAAGA CAGATTGAGA GCTTGGGCAG AAGATGCAGA  
3481 CATAGCCCTG GTCTTGTTAC GTGGTAATGG TTCTAAAGCA TTTTGCAGCAG GTGGTGACGT  
3541 TGTCCTAATA GCTAAGAAAT GTTTGGCCTC CCCAGGTGAA GCCCTGAAT TGGCTGAAAG  
3601 ATTTTTCGCT AGAAGTTACA GATTATGACA TTATTTGCAC ACATACCCAA AGCCTTTGAT  
3661 ATGCTGGGCT CATGGTCACG TTTTAGGTGG TGGTATGGGT TTGTTACAAG GTGCTGGTAT  
3721 TAGAATAGTC ACCCCATCTT CAAGATTGGC AATGCCTGAA ATCTCTATTG GTTTATTTCC  
3781 AGATGTTGGT GGTTCCTTCT TCTTAAAGTA ATTGCCTGGT AAATTTGGGT TATTTTTTCGG  
3841 TTTAATGATG TCACCATTTG ATGCCAGAGA TGCTTTGGAC TTAACCTTGG CTGATAGATT  
3901 CTTGTTAGAT ACTCAACAAG ACGCATTTGAT CGATGGTTTG ATCCAATTGA ACTGAGAGAG  
3961 ACAACCAGAT TTGCAATTGC ATTCCTTGTG AAAGGCTTTA GAACAACAAG CAAGAAGTGA  
4021 ATTACCAGCT GCACAATGGT TGCCCTAGAAG AGAAAAGATTA GACGCTTGT TAGATCAAGC  
4081 TACTTTACCA TTGTCTTGGC AAGCCTTAGC TTCATTGGAA AACGATGAAG ACGCATTTGT  
4141 AGCCAAAGCC GCTAAGACTA GTTTGGGTGG TTCACCTTTA ACAGGTCAAT TGGCTGGGG  
4201 TCAAATTAGA AGAGCTAGAC ACTTATCTTT GGCACAAGTA TTTCAAATGG AATACGGCAT  
4261 GTCATTGAAT TGTTGCAGAC ATCCAGAATT TGCAGAAGGT GTAAGAGCCA GATTAATCGA  
4321 TAAAGACCAC GCTCCACATT GGCCTGGCC TGACGTA AAC CAAGTTCCTG AAGCCGTTAT  
4381 TGCAGCCCAT TTTGCACCAT TAGATGACCA CCTTTTAGCT GATTTGGCAT AACGATACCG  
4441 TCGACCTCGA GTCATGTAAT TAGTTATGTC ACGCTTACAT TCACGCCCTC CCCCCACATC  
4501 CGCTCTAACC GAAAAGGAAG GAGTTAGACA ACCTGAAGTC TAGGTCCCTA TTTATTTTTT  
4561 TATAGTTATG TTAGTATTTA GAACGTTATT TATATTTCAA ATTTTCTTTT TTTTCTGTGA  
4621 CAGACGCGTG TACGCATGTA ACATTATACT GAAAACCTTG CTTGAGAAGG TTTTGGGACG  
4681 CTCGAAGGCT TTAATTTGCG GCCGGACCAA CTATCATCCG CTAATTACTG ACATTACCAA  
4741 ATGAGATCTG TGAATGGGCA AGATAAAAAA CAAAAATTGA AATGTTTGGC GTTATGTAAA  
4801 ACTATTAATT CCTTCGCTTT CGGCGGTCAC AGAATTTGCG TGTAAGTGC TCTTGTTCAA  
4861 TCAATATCAT TTGTTACTTT ATTTGAAAGT CTGTATTACT GCGCCTATTG TCATCCGTAC  
4921 CAAAGAACGT CAAAAAGAAA CAAGATAATT TTTGTGCTTA CACCATTTAT AGATCACTGA  
4981 GCCCAGATA TCGCTGGAGC TCAGTGTAAG TGGCATGAAC ACAACTCTGA CTGATCGCAC  
5041 ATATTGCCGT TATCATAAAT ACTAGTTGTA CTTGTCAATG CGACGAATGG CATCATGCCT  
5101 ATTTATTAGT TCCTCTTTTT CCGTTTCTAG TTTCCAGAAT GCTATTGAAT CTAACACTTC  
5161 AATTATAAAA AAGAATAAAT CCGCAATAAT TTTAGGCTAA TTGTTGTACT GTCAGCGGAA  
5221 CCTAATGGTT AAAATTCAGA GGAACCTTCG ACGTAGTCTG ATCGCTACTT CTATATCTTA  
5281 TGTTCCAGT CAATCAAAAAG TTGATACTAT AATAGCTGCC ATTTATACCT GTTAGTTATG  
5341 GCGATCGTTT ATCAGC

SEQ ID NO: 43. Fragmento de recombinación lineal para la integración genómica de F6AA82-2 en el gen BUD21 de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*

ES 2 698 500 T3

1 AACTCAATCG TGCTAAGCGA CAAACTGAAA AGGTATATCA ACCAGAGATG AAATCGGAAA  
 61 TTAGCGGGGA TAGCACTCTG AAACGTGTTT AAGTCACTT CCACGGGAAT GGTCGGGTAA  
 121 ATAAAAAGAA AAAGAAGGTT CCTCCACGGA AAGATGGTAT CAAGTTCCGT TGATTGAAAA  
 181 TTTTTCTTTT CAAGCGATGA GGTAGCGAA GTTGTTCGAA CAAGCCCAA TATGTTTAGA  
 241 AGGCAGTACG AATTGATACC CTGAACGTGT ACTACATACC ACAGCTTTT ACATTCAATT  
 301 ATCATTTTTT TTTTATTCTT TTTTTTGATT TCGGTTTCTT TGAAATTTTT TTGATTCCGT  
 361 AATCTCCGAA CAGAAGGAAG AACGAAGGAA GGAGCACAGA CTTAGATTGG TATATATACG  
 421 CATATGTAGT GTTGAAGAAA CATGAAATTG CCCAGTATTC TTAACCCAAC TGCACAGAAC  
 481 AAAAACCTGC AGGAAACGAA GATAAATCAT GTCGAAAGCT ACATATAAGG AACGTGCTGC

541 TACTCATCCT AGTCCTGTTG CTGCCAAGCT ATTTAATATC ATGCACGAAA AGCAAACAAA  
 601 CTTGTGTGCT TCATTGGATG TTCGTACCAC CAAGGAATTA CTGGAGTTAG TTGAAGCATT  
 661 AGGTCCCAAA ATTTGTTTAC TAAAAACACA TGTGGATATC TTGACTGATT TTTCCATGGA  
 721 GGGCACAGTT AAGCCGCTAA AGGCATTATC CGCCAAGTAC AATTTTTTAC TCTTCGAAGA  
 781 CAGAAAATTT GCTGACATTG GTAATACAGT CAAATTGCAG TACTCTGCGG GTGTATACAG  
 841 AATAGCAGAA TGGGCAGACA TTACGAATGC ACACGGTGTG GTGGGCCAG GTATTGTTAG  
 901 CGGTTTGAAG CAGGCGCAG AAGAAGTAAC AAAGGAACCT AGAGGCCTTT TGATGTTAGC  
 961 AGAATTGTCA TGCAAGGGCT CCCTATCTAC TGGAGAATAT ACTAAGGGTA CTGTTGACAT  
 1021 TGCGAAGAGC GACAAAGATT TTGTTATCCG CTTTATTGCT CAAAGAGACA TGGGTGGAAG  
 1081 AGATGAAGGT TACGATTGGT TGATTATGAC ACCCGTGTG GGTTTAGATG ACAAGGGAGA  
 1141 CGCATTGGGT CAACAGTATA GAACCGTGA TGATGTGGTC TCTACAGGAT CTGACATTAT  
 1201 TATTGTTGGA AGAGGACTAT TTGCAAAGGG AAGGGATGCT AAGGTAGAGG GTGAACGTTA  
 1261 CAGAAAAGCA GGCTGGGAAG CATATTTGAG AAGATGCGGC CAGCAAAACT AAAAAACTGT  
 1321 ATTATAAGTA AATGCATGTA TACTAACTC ACAAAATTGA GCTTCAATTT AATTATATCA  
 1381 GTTATTACCC TATGCGGTGT GAAATACCCG AAGATGCGT ACAGAGAAAA TACCGCATCA  
 1441 GGATAGCTTC AAAATGTTTC TACTCCTTTT TTACTCTTCC AGATTTTCTC GGACTCCGCG  
 1501 CATGCCCGTA CCACTTCAAA ACACCCAAGC ACAGCATACT AAATTTCCCC TCTTCTTCC  
 1561 TCTAGGGTGT CGTTAATTAC CCGTACTAAA GGTTTGGAAA AGAAAAAGA GACCGCCTCG  
 1621 TTTCTTTTTT TCCGTCGAAA AAGGCAATAA AAATTTTTAT CACGTTTCTT TTTCTTGAAA  
 1681 ATTTTTTTTT TGATTTTTTT CTCTTTCGAT GACCTCCCAT TGATATTTAA GTTAATAAAC  
 1741 GGCTTCAAT TTCTCAAGTT TCAGTTTCAT TTTTCTTGT CTATTACAAC TTTTTTACT  
 1801 TCTTGCTCAT TAGAAAAGAA GCATAGCAAT CTAATCTAAG TTTAAAACAA TGAATGTCAC  
 1861 CTTTGAAGAA AGAGCCAGTT TACACGGTTA CAGAATCGGT ATCGCATCCT TAGACCCCC  
 1921 AGCATCCTTG AACGCTTTGT CTTTACCAAT GATTGATGCT TTACAAGACA GATTGAGAGC  
 1981 TTGGGCAGAA GATGCAGACA TAGCCTGTGT CTTGTTACGT GGTAAATGGTT CTAAGCATT  
 2041 TTGCGCAGGT GGTGACGTTG TCCAATTAGC TAAGAAATGT TTGGCCTCCC CAGGTGAAGC  
 2101 CCTTGAATTG GCTGAAAGAT TTTTCGTTAG AAGTTACAGA TTAGACTATT ATTTGCACAC  
 2161 ATACCCAAAG CTTTGTATAT GCTGGGCTCA TGGTCACGTT TTAGGTGGTG GTATGGGTTT  
 2221 GTTACAAGGT GCTGGTATTA GAATAGTCAC CCCATCTTCA AGATTGGCAA TGCCTGAAAT  
 2281 CTCTATTGGT TTATTTCCAG ATGTTGGTGG TTCCCATTTC TTAAGTAGAT TGCCCTGGTAA  
 2341 ATTTGGTTTT TTTTTCGGTT TAACCGTTT ACCATTGAAAT GCCAGAGATG CTTTGGACTT  
 2401 AAACCTGGCT GATAGATTCT TGTTAGATAC TCAACAAGAC GCATTGATCG ATGGTTTGAT  
 2461 CCAATTGAAC TGGAGAGAAC AACCAGATTT GCAATTGCAT TCCTTGTTAA AGGCTTTAGA  
 2521 ACAACAAGCA AGAAGTGAAT TACCAGCTGC ACAATGGTTG CCTAGAAGAG AAAGATTAGA  
 2581 CGCCTTGTTA GATCAAGCTA CTTTACCATT GTCTTGGCAA GCCTTAGCTT CATTGAAAA  
 2641 CGATGAAGAC GCATTGTTAG CCAAAGCCGC TAAGACTATG TTGGGTGGTT CACCTTTAAC  
 2701 AGGTCATTTG GTCTGGGGTC AAATTAGAAG AGCTAGACAC TTATCTTTGG CACAAGTATT  
 2761 TCAAATGGAA TACGGCATGT CATTGAATTG TTGCAGACAT CCAGAATTTG CAGAAGGTGT  
 2821 AAGAGCCAGA TTAATCGATA AAGACCACGC TCCACATTGG CACTGGCCTG ACGTAAACCA  
 2881 AGTTCCCTGAA GCCGTTATTG CAGCCCATTT TGCACCATTA GATGACCACC CTTTAGCTGA  
 2941 TTTGGCATAA CGATACCGTC GACCTCGAGT CATGTAATTA GTTATGTCAC GCTTACATTC  
 3001 ACGCCCTCCC CCCACATCCG CTCTAACCAG AAAGGAAGGA GTTAGACAAC CTGAAGTCTA  
 3061 GGTCCTTATT TATTTTTTTA TAGTTATGTT AGTATTAAGA ACGTTATTTA TATTTCAAT  
 3121 TTTTCTTTTT TTTCTGTACA GACCGGTGTA CGCATGTAAC ATTATACTGA AAACCTTGCT  
 3181 TGAGAAGGTT TTGGGACGCT CGAAGGCTTT AATTTGCGGC CGTACAATCA CAAAATTAAT  
 3241 CATAATGTTT ATTTATCTAT AATCAAACAA TGAGAATATA TACTGAAGTT TGGTAGGTTA  
 3301 TTCTTCAGAG ATGCAGTACG ATATCACCAG CGGTATGCAG ACACCTATCA AAACATAAAC  
 3361 GGATTCATCA TGAGGTAAAA CGACTTCTG TTCAACGCTG ATGATCGTAT CATGAGAATC  
 3421 TCCACCAACA AATGCTGTGA AAGACGCATA TAGTAAACTG CCACCACTCA TAAGCAGAAG  
 3481 ATTTCCACTT AT

ES 2 698 500 T3

**SEQ ID NO: 44.** Codón de secuencia de ADN SeACS (L641P) optimizado para la expresión en *S. cerevisiae*

```

1 ATGTCCCAA CTCATAAGCA CGCTATTCCA GCTAATATTG CTGATAGATG CTTGATCAAC
61 CCAGAACAAT ACGAAACTAA GTACAAGCAA TCCATCAACG ATCCAGATAC TTTTGGGGT
121 GAACAAGGTA AGATTTTGGG TTGGATTACC CCATACCAA AGGTCAAGAA TACTTCTTTT
181 GCTCCAGGTA ACGTTTCCAT CAAATGGTAT GAAGATGGTA CTTTGAACCT GGCTGCTAAC
241 TGTTTGGATA GACACTTGC AAAAAACGGT GATAGAACCG CTATTATTG GGAAGGTGAT
301 GATGCCTCTC AATCCAAACA TATCTCTTAC AGAGAATTGC ACAGAGATGT CTGTAGATTG
361 GCTAACACTT TGTTGGATTT GGGTATTAAG AAGGGTGACG TTGTTGCTAT CTATATGCCA
421 ATGGTTCCTG AAGCTGCTGT TGCTATGTTG GCTTGTGCTA GAATTGGTGC TGTTTCACTT
481 GTTATTTTCG GTGGTTTTTC ACCAGAAGCT GTTGCCGTA GAATTATCGA TTCTTCATCC
541 AGATTGGTTA TCACCGCTGA TGAAGGTGTT AGAGCTGGTA GATCAATTCC ATTGAAAAAG
601 AACGTTGATG ACGCCTTGAA GAACCCAAAT GTTACTTCTG TTGAACACGT CATCGTTTTG
661 AAGAGAACCG ATTCTGATAT TGACTGGCAA GAAGGTAGAG ATTTGTGGTG GAGAGATTTG
721 ATTGAAAAGG CTCTCCAGA ACATCAACCA GAAGCAATGA ACGCTGAAGA TTCTTTGTTT
781 ATCTTGTACA CTTCTGGTTC TACTGGTAAG CCAAAGGTG TTTTACACAC TACTGGTGGT
841 TATTTGGTTT ACGCTGCTAC TACTTTCAAG TACGTTTTCG ATTATCATCC AGGTGACATC
901 TATTGGTGTG CTGCTGATGT TGGTTGGGTT ACTGGTCATT CTTATTTGTT GTATGGTCCA
961 TTAGTTTTCG GTGCTACTAC CTTGATGTTT GAAGGTGTTT CAAATTGGCC GAAGGTGTTT
1021 AGAATGTGTC AAGTTGTTGA CAAACACCAA GTCAACATCT TGTATACTGC TCCAACGTCT
1081 ATTAGAGCTT TGATGGCTGA AGGTGATAAG GCTATTGAAG GTACTGATAG ATCCTCCTTG
1141 AGAATCTTGG GTTCTGTTGG TGAACCTATT AACCTGAAG CTTGGGAATG GTACTGGAAG

1201 AAAATTGGTA AAGAAAAGTG CCCAGTTGTT GATACTTGGT GGCAAACCTGA AACAGGTGGT
1261 TTTATGATTA CTCCATTGCC AGGTGCTATT GAATTGAAAG CTGGTTCIGC TACTAGACCA
1321 TTTTGGGTG TTCAACCAGC CTTGGTTGAT AATGAAGGTC ATCCACAAGA AGGTGCTACT
1381 GAAGGTAATT TGGTTATTAC TGATTCTTGG CCAGGTCAAG CTAGAACCTT GTTTGGTGAT
1441 CACGAAAGAT TCGAACAAAC CTACTTTTCC ACCTTCAAGA ACATGTACTT TTCTGGTGAT
1501 GGTGCTAGAA GAGATGAAGA TGGTACTAT TGGATTACCG GTAGAGTTGA TGATGTCTTG
1561 AATGTTTCTG GTCACAGATT GGGTACAGCC GAAATTGAAT CTGCTTTGGT TGCTCATCCA
1621 AAGATTGCTG AAGCAGCAGT TGTGGTATT CCACATGCTA TTAAGGGTCA AGCAATCTAC
1681 GCTTACGTTA CCTTGAATCA TGGTGAAGAA CCATCCCAG AATTATACGC TGAAGTTAGA
1741 AACTGGGTCA GAAAAGAAAT TGGTCCATTG GCTACTCCAG ATGTTTTACA TTGGACAGAT
1801 TCTTTGCCAA AGACCAGATC AGGTAAGATC ATGAGAAGAA TCTTGAGAAA AATTGCTGCC
1861 GGTATACTT CTAACCTGGG TGATACCTCT ACTTTGGCTG ATCCAGGTGT TGTTGAAAAG
1921 CCATTAGAAG AAAAGCAAGC CATTGCCATG CCATCTTAA

```

**SEQ ID NO: 45.** UniProt ID A4XS22 derivado de malonil-CoA hidrolasa de *Pseudomonas mendocina* (cepa ymp)

```

1
MNLQFEERPSLHGYRIGIASLDAEKSLNALTLPMIQALDARLQAWAEDPTIACVMLRNG
61
PKAFCAGGDVVQLVQQCREHPGEVPPLARRFFAD1YRLDHRHHSYPKPFICWAHGHVLLGG
121
GMGLMQGAGVRI VTPSSRLGMPEINIGLYPDVGGSWFLARLPGRLLGLFLGLTAASINARD
181
ALDLNLADRFLRDDQDALLEGLVQLNWREQPAAQLHSLLRALENEARGELPAAQWLPRR
241
ERIDELLDVADLPAAVQAI SALQQDDDALLARA AKTLAHGCPLTAHLVWQQIRRARHLSL
301
AEVFRMEYAMSLNCCRHPDFPEGVRARLIDKDQTPHWHWPDVAAIPEAVIEAHFAPAWEG
361 EHPLADL

```

## ES 2 698 500 T3

**SEQ ID NO: 46.** malonil-CoA hidrolasa derivada de UniProt ID B9IZZ9 de *Bacillus cereus* (cepa Q1)

1  
MTEHVLFVSENGVASITLNRPKALNSLSYDMLQPIGQKLKEWENDERIALIVLKGAGTK  
61  
GFCAGGDIKTLYEARSNEAALQHAERFFEEEX<sub>1</sub>YEIDTYIYQYKKPIIACLDGIVMGGGVGL  
121  
TNGAKYRIVTERTKWAMPEMNIGFFPDVGAAYFLNKAPGYAGRYVALTASILKASDVLF I  
181  
NAADYFIASDSLPNFLTELESVNWSKEDDVHHLKEVIRTFATAPTLESELAPSLEEINS  
241  
HFAFDTIEEIIHSLEKDQSSFSLKAKETLLSKSPI SLKVTLKQFIDGQNKSVEECFATDL  
301 VLAKNFMRHEDFFEGVRSVVVDKQNPYKYKQLSDVSEEDVNRFFNLLNA

**SEQ ID NO: 47.** malonil-CoA hidrolasa derivada de UniProt ID C3ALI3 de *Bacillus mycoides* Rock1-4

1  
MRRYIRGGFKMTENVLFSIHENGVASITLNRPKALNSLSYDMLHPIGQKLKEWEKDDRIA  
61  
VVILKGAGTKGFCAGGDIKTLYEARSNEVALQHAEHFFEEEX<sub>1</sub>YEIDTYIYHYPKPIIACLD  
  
121  
GIVMGGGVGLTNGAKYRIVTDRTKWAMPEMNIGFFPDVGAAYFLNKAPGQTGRYVALTAS  
181  
VLKAADVLYIKAADHYMPSETLPTFLDAIEKVNWHQNIHITLKELINKYETAPSVESSEL  
241  
VSLLEEIDQHFSFHTVEDIIHSLDNADGSFASKTKETLLSKSPFSLKVTLKQLIDGKEKS  
301  
IEECFATDLVLAKNFMRHEDFFEGVRSVVVDKQNPYKYKQLSDVSEEDVNRFFNLLNA

**SEQ ID NO: 48.** malonil-CoA hidrolasa derivada de UniProt ID E2XN63 de *Pseudomonas fluorescens* WH6

## ES 2 698 500 T3

1  
MNLHFEELTGSDGARIGIASLDAEKSLNALS LPMILALGDRLDAWAKDPNIVCVLLRGNG  
61  
PKAFCAGGEVRS LALACREQPGEVPALAAQFFAAX<sub>1</sub>YRLDYRLHTFPKPLICWGHGYVLGG  
121  
GMGLLQSAAVRI VTPSSRLAMPEISIGLYPDVGASWFLSRLPGKLGFLGLTGAVNGRD  
181  
ALDLGLADRFLRDDQQDELIEGLLQLNWQEQTAMQLNSLFKALAQEAVDQLPEAQWLPRR  
241  
AQIDEWLDVGDVRS AWRALSQLRDHADPLFSRAGKTLSEGCPHTAHLVWEQIQRARHLSL  
301  
AQVFQMEYTLNCCRHP EFSEGVRRARLIDKDQTPRWHWPDVHTLPDAVVQAHFNKAWEG  
361 RHPLADLSDY

**SEQ ID NO: 49.** malonil-CoA hidrolasa derivada de UniProt ID F0PNG8 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus* (cepa YBT-020)

1  
MTEHVLFSVSENGVASITLNRPKALNSLSYDMLQPIGQKLEWEHDERIALIVLKGAGTK  
61  
GFCAGGDIKTLYEARSNEAALQHAERFFFEEX<sub>1</sub>YEIDTYIYQYKKPIIACL DGIVMGGGVGL  
121  
TNGAKYRIVTERTKWAMPEMNIGFFPDVGAAYFLNKAPGYAGRYVALTASILKAADVLF I  
181  
NAADYFIASD SLPNFLTELESVNWPKKDDVHTLKEVIRTFATAPTLESELAPSLEEINS  
241  
HFAFDTIEEIIHSLEKDQSSFALKAKETLLSKSPI SLKVTLKQFIDGQNKSVEECFATDL  
301 VLAKNFMRHEDFFEGVRSVVVDKQNP DYKYKQLSDVSEEDVNRFFNLLNA

**SEQ ID NO: 50.** malonil-CoA hidrolasa derivada de UniProt ID F6AA82 de *Pseudomonas fulva* (cepa 12-X)

1  
MNVTFEERASLHG YRIGIASLDAPASLNALS LPMIDALQDRLRAWAEDADIACVLLRGNG  
61  
SKAFCAGGDVVQLAKKCLASPGEAPELAERFFARX<sub>1</sub>YRLDHYLHTY PKPLICWAHGHVVLGG

## ES 2 698 500 T3

121  
GMGLLQGAGIRIVTPSSRLAMPEISIGLFPDVGGSHFLSRLPGKLGGLFFGLTASPLNARD  
181  
ALDLNLADRFLLDLDTQQDALIDGLIQLNWREQPDQLHSLKALEQQARSELPAAQWLPRR  
241  
ERLDALLDQATLPLSWQALASLENDEDALLAKAAKTMLGGSPLTGHLVWGQIRRARHLSL  
301  
AQVFQMEYGMSLNCCRHPFEFAEGVRARLIDKDHAPHWHWPVDVNQVPEQVIAAHFAPLDDH  
361 PLADLA

**SEQ ID NO: 51.** malonil-CoA hidrolasa derivada de UniProt ID Q63BK8 de *Bacillus cereus* (cepa ZK/E33L)

1  
MTEHVLFSVSENGVASITLNRPKALNSLSYEMLQPIGKCLKEWENDEQIALIVLKGAGTK  
61  
GFCAGGDIKTLYEARSNEIALQHAERFFEEEX<sub>1</sub>YEIDTYIYQYKKPIIACLDGIVMGGGVGL  
121  
TNGAKYRIVTERTKWAMPEMNI GFFPDVGAAYFLNKAPGFAGRYVALTASILKASDVLF I  
181  
NAADYFMTSDSLPKFLTELESVNWHKGDDVHIHLKEVIRTFATTSNLESELAPLLEEINA  
241  
HFAFDTIEEIIHSLEKDQSSFALKTKKTLKSKSPISLKVTLKQFIDGHDKSVEECFATDL  
301 VLAKNFMRHEDFFEGVRSVVVDKQNPYKYKQLSDVSEDEDVNRFFNLLNA

**SEQ ID NO: 52.** malonil-CoA hidrolasa derivada de UniProt ID Q81DR3 de *Bacillus cereus* (cepa ATCC 14579/DSM 31)

1  
MTEQVLFVSENGVATITLNRPKALNSLSYDMLQPIGQCLKWEHDERIALIVLKGAGTK  
61  
GFCAGGDIKTLYEARSNEVALQHAERFFEEEX<sub>1</sub>YEIDTYIYQYTKPIIACLDGIVMGGGVGL  
121  
TNGAKYRIVTERTKWAMPEMNI GFFPDVGAAYFLNKAPGYTGRFVALTASILKASDVLF I  
181  
NAADYFMTSDSLPEFLTELESVNWHKEDDVHTNLKEVIRTFATAPNLESELAPSLEVINS  
241  
HFAFDTIEEIIHSLEKDESSFALKTKEILLSKSPISLKVTLKQFIDGQDKSVEECFATDL  
301 ILAKNFMRHEDFFEGVRSVVVDKQNPYKYKQLSDVSEEDVNRFFNLLNA

**SEQ ID NO: 53.** FabD de tipo salvaje de *E. coli*

## ES 2 698 500 T3

1 MTQFAFVFPQ QGSQTVGMLA DMAASYPIVE ETFAEASAAL GYDLWALTQQ GPAAELNKTW  
61 QTQPALLTAS VALYRVWQQQ GKKAPAMMAG HSLGEYSALV CAGVIDFADA VRLVEMRGKF  
121 MQEAVPEGTG AMAAIIGLDD ASIAKACEEA AEGQVVSPVN FNSPGQVVIA GHKEAVERAG  
181 AACKAAGAKR ALPLPVSVPS HCALMKPAAD KLAVELAKIT FNAPTVPVVN NVDVKCETNG  
241 DAIRDALVRQ LYNPVQWTKS VEYMAAQGVE HLYEVGPGKV LTGLTKRIVD TLTASALNEP  
301 SAMAAALEL

## REIVINDICACIONES

1. Una célula huésped recombinante que comprende una malonil-CoA hidrolasa heteróloga, en la que dicha malonil-CoA hidrolasa heteróloga se selecciona de:
- 5 (a) SEQ ID No: 46, 49, 51 y 52, en las que Xaa se selecciona de A, D, R, H, K, S, T, N, Q e Y;  
 (b) SEQ ID No: 45, 48 y 50, en las que Xaa se selecciona de A, D, R, H, K, S, T, N, Q e Y; y  
 (c) SEQ ID NO. 47, en la que Xaa es S.
2. La célula huésped recombinante de la reivindicación 1, que se selecciona de una levadura; una especie de *Candida*, *Cryptococcus*, *Komagataella*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* o *Yarrowia*; y una especie de *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas* o *Streptomyces*.
- 10 3. La célula huésped recombinante de la reivindicación 2, que es una especie de *Pichia*, *Saccharomyces* o *Escherichia*.
4. La célula huésped recombinante de la reivindicación 3 que es *Pichia kudriavzevii*.
5. La célula huésped recombinante de la reivindicación 3 que es *Saccharomyces cerevisiae*.
- 15 6. La célula huésped recombinante de la reivindicación 3 que es *Escherichia coli*.
7. La célula huésped recombinante de la reivindicación 1, que comprende además uno o más de los siguientes:
- una acetil-CoA sintetasa heteróloga seleccionada de ACS1 de *S. cerevisiae*, ACS2 de *S. cerevisiae*, Acs de *Salmonella enterica*, AcsA de *Escherichia coli* y AcsA de *Bacillus subtilis*;
- 20 una enzima compleja heteróloga piruvato deshidrogenasa de *S. cerevisiae* seleccionada de PDA1, PDB1, LAT1, LPD1 y PDX1;
- una enzima heteróloga de la vía catabólica del etanol;
- una ATP citrato liasa heteróloga;
- una acetil-CoA carboxilasa heteróloga;
- 25 una modificación genética que disminuye el catabolismo del malonato;
- una proteína de transporte heteróloga seleccionada de PDR5, PDR10, PDR11, PDR12, PDR15 y PDR18;
- una modificación genética que aumenta la tolerancia de la célula huésped al malonato; y
- una modificación genética que mejora el catabolismo de la célula huésped de las fuentes de carbono seleccionadas de etanol, acetato y sacarosa.
- 30 8. La célula huésped recombinante de la reivindicación 5, que comprende además una acetil-CoA carboxilasa que es acetil-CoA carboxilasa ACC de *Yarrowia lipolytica*.
9. Un procedimiento de producción de malonato que comprende las etapas de cultivar una célula huésped de la reivindicación 1 en condiciones que dan como resultado la producción de malonato; y separar el malonato del caldo de fermentación de la célula huésped, en el que dicha separación se logra ya sea por:
- 35 la adición de una sal de calcio al caldo de fermentación para precipitar el malonato de calcio, y separar el malonato precipitado del caldo de fermentación para proporcionar malonato, o bien
- el ajuste del pH del caldo de fermentación a 2,0 o inferior, la adición de una amina alifática al caldo de fermentación, la transferencia de ácido malónico del caldo de fermentación por transferencia de fase a un disolvente orgánico o la combinación de disolventes orgánicos y eliminación de la amina alifática y el disolvente orgánico para proporcionar ácido malónico purificado.
- 40 10. Un procedimiento de producción de acrilato, que comprende las etapas de cultivar una célula huésped de la reivindicación 1 en condiciones que dan como resultado la producción de malonato; recuperar el malonato del caldo de fermentación; y hacer reaccionar el malonato y el paraformaldehído en una base que contiene un disolvente orgánico a una temperatura entre 50 °C y 90 °C.
- 45

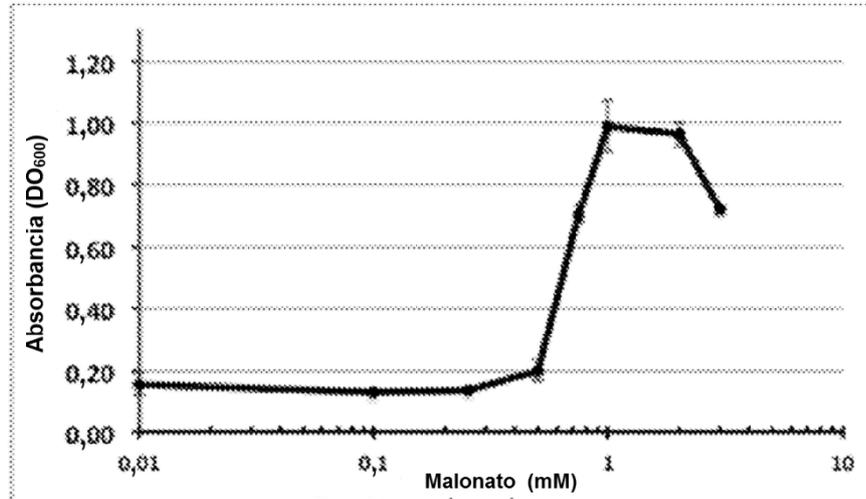


Figura 1

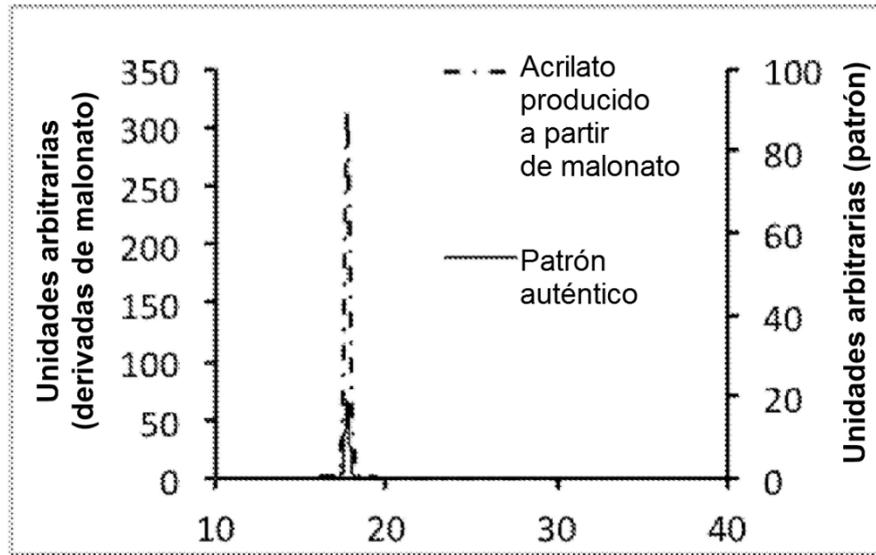


Figura 2