

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 747**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21	(2006.01)	C12P 7/02	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)	C12P 7/04	(2006.01)
C12N 9/02	(2006.01)	C12P 7/42	(2006.01)
C12N 9/04	(2006.01)	C12N 15/70	(2006.01)
C12N 9/10	(2006.01)		
C12N 9/12	(2006.01)		
C12N 9/18	(2006.01)		
C12N 9/88	(2006.01)		
C12P 5/00	(2006.01)		
C12P 5/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2012 PCT/US2012/035687**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12149491**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012 E 12720353 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2702140**

54 Título: **Microorganismos recombinantes para la producción potenciada de mevalonato, isopreno e isoprenoides**

30 Prioridad:
29.04.2011 US 201161481121 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2019

73 Titular/es:
**DANISCO US INC. (50.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304-1013 , US y
THE GOODYEAR TIRE & RUBBER COMPANY
(50.0%)**

72 Inventor/es:
**BECK, ZACHARY, Q.;
MILLER, MICHAEL, C.;
PERES, CAROLINE, M.;
PRIMAK, YULIYA, A.;
PUCCI, JEFF, P. y
WELLS, DEREK, H.**

74 Agente/Representante:
FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 699 747 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

Microorganismos recombinantes para la producción potenciada de mevalonato, isopreno e isoprenoides

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/481.121 presentada el 29 de abril de 2011.

Campo de la invención

10 Esta divulgación se refiere a composiciones y métodos para la producción aumentada de mevalonato, isopreno, isoprenoides y moléculas precursoras de isoprenoides en microorganismos recombinantes, así como a métodos para producir y usar los mismos.

Antecedentes de la invención

15 El R-mevalonato es un producto intermedio de la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato que convierte acetil-CoA en difosfato de isopentenilo y difosfato de dimetilalilo. La conversión de acetil-CoA en mevalonato puede catalizarse mediante las actividades tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa de la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato superior (ruta de MVA). Basándose en la conversión molar de glucosa en acetil-CoA por
20 medio de glicólisis, el rendimiento en masa teórico para la producción de mevalonato usando las enzimas de la ruta de MVA superior tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa es del 54,8 %.

25 Comercialmente, se ha usado mevalonato como aditivo en cosméticos, para la producción de polímeros biodegradables, y puede tener valor como elemento estructural quiral para la síntesis de otros productos químicos.

30 Los productos de la ruta dependiente de mevalonato son pirofosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP). IPP y DMAPP son precursores de isopreno así como isoprenoides. El isopreno (2-metil-1,3-butadieno) es el monómero del caucho natural y también un motivo estructura común para una inmensa variedad de otros compuestos que se producen de manera natural, denominados conjuntamente los isoprenoides. El isopreno es
adicionalmente el material de partida crítico para una variedad de polímeros sintéticos, lo más notablemente cauchos sintéticos.

35 Los isoprenoides son compuestos derivados de las moléculas precursoras de isoprenoides IPP y DMAPP. Se han identificado más de 29 000 compuestos isoprenoides y están descubriéndose nuevos isoprenoides cada año. Los isoprenoides pueden aislarse a partir de productos naturales, tales como microorganismos y especies de plantas que usan moléculas precursoras de isoprenoides como elemento estructural básico para formar las estructuras relativamente complejas de los isoprenoides. Los isoprenoides son esenciales para la mayoría de los organismos y células vivos, proporcionando un medio para mantener la fluidez de la membrana celular y el transporte de
40 electrones. En la naturaleza, los isoprenoides desempeñan papeles tan diversos como pesticidas naturales en plantas contribuyendo a los aromas asociados con canela, clavo y jengibre. Además, las comunidades farmacéuticas y químicas usan isoprenoides como productos farmacéuticos, nutracéuticos, agentes aromatizantes y agentes de control de plagas agrícolas. Dada su importancia en sistemas biológicos y utilidad en una amplia gama de aplicaciones, los isoprenoides han atraído mucha atención de los científicos. Hemmi *et al.* (J. Biochem 123, 1088-1096 (1998)) identifican genes candidatos en la síntesis de isoprenoides en *E. coli*. Tao *et al.* (FEMS Microbiología
45 letters 243 (2005) 227-233) notifican mutaciones en *E. coli*, que afectan a la producción de carotenoides.

50 Los medios convencionales para obtener mevalonato e isoprenoides incluyen extracción a partir de materiales biológicos (por ejemplo, plantas, microbios y animales) y síntesis orgánica parcial o total en el laboratorio. Sin embargo, tales medios han demostrado generalmente no ser satisfactorios. En particular, para isoprenoides, dada la frecuentemente compleja naturaleza de su estructura molecular, la síntesis orgánica es poco práctica dado que se requieren habitualmente varias etapas para obtener el producto deseado. Adicionalmente, estas etapas de síntesis química pueden implicar el uso de disolventes tóxicos como también la extracción de isoprenoides a partir de
55 materiales biológicos. Además, estos métodos de extracción y purificación dan como resultado habitualmente un rendimiento relativamente bajo del isoprenoide deseado, ya que los materiales biológicos contienen normalmente solo cantidades minúsculas de estas moléculas. Desafortunadamente, la dificultad que implica la obtención de cantidades relativamente grandes de isoprenoides ha limitado su uso práctico.

60 Desarrollos recientes en la producción de isopreno, moléculas precursoras de isoprenoides e isoprenoides divulgan métodos para la producción de isopreno e isoprenoides a velocidades, títulos y purezas que pueden ser suficientes para cumplir las exigencias de procedimientos comerciales robustos (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2009/076676 A2 y la patente estadounidense n.º 7.915.026); sin embargo, se necesitan todavía mejoras para aumentar la producción de isopreno e isoprenoides y para aumentar los rendimientos de los mismos.

65 Tales mejoras se proporcionan en el presente documento mediante la divulgación de composiciones y métodos para aumentar la producción de mevalonato como producto intermedio de la ruta de biosíntesis dependiente de

mevalonato así como para aumentar la producción de moléculas derivadas de mevalonato, tales como isopreno, precursores de isoprenoides y/o isoprenoides.

5 A lo largo de toda esta memoria descriptiva, se hace referencia a diversas patentes, solicitudes de patente y otros tipos de publicaciones (por ejemplo, artículos de revistas).

Sumario de la invención

10 La invención proporcionada en el presente documento divulga, entre otros, composiciones y métodos para la producción aumentada de mevalonato, isopreno, moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides en microorganismos usando manipulaciones génicas específicas en microorganismos recombinantes que dan como resultado un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato.

15 Específicamente, la presente invención proporciona:

[1] Células bacterianas recombinantes capaces de una producción aumentada de isopreno en las que las células se modifican por ingeniería genética mediante modulación de la actividad citrato sintasa para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de isopreno de manera que la actividad de citrato sintasa se disminuye, y en las que la actividad de las siguientes enzimas:

20 (a) fosfotransacetilasa

(b) acetato cinasa, y

25 (c) lactato deshidrogenasa,

se modula,

y en las que opcionalmente la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en:

30 (d) malato deshidrogenasa,

(e) piruvato deshidrogenasa,

35 (f) fosfogluconolactonasa (PGL), y

(g) fosfoenolpiruvato carboxilasa

40 se modula, y en las que dichas células comprenden además (i) uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de mevalonato (MVA) y (ii) uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa; y en las que dichas células producen cantidades aumentadas de isopreno en comparación con células productoras de isopreno que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia isopreno.

45 [2] Las células bacterianas de [1],

(A) en las que el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA superior, en las que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA superior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de AA-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa, en las que opcionalmente dichos uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la ruta de mevalonato (MVA) superior son un gen *mvaE* y un gen *mvaS*, y en las que además opcionalmente el gen *mvaE* y el gen *mvaS* se seleccionan del grupo que consiste en: (a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Listeria grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Enterococcus faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Enterococcus gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Enterococcus casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Enterococcus faecalis*, o

55 (B) en las que el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA inferior, en las que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA inferior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de MVK, PMK y MVD, en las que opcionalmente la MVK se selecciona del grupo que consiste en mevalonato cinasa de *Metanosarcina mazei*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Metanococcoides burtonii*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus sakei*, polipéptido de mevalonato cinasa de levadura, polipéptido de mevalonato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus pneumoniae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* y polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* CL190, o

65 (C) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más

polipéptidos de la ruta de DXP, o

(D) en las que el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido de *Pueraria* o *Populus* o un híbrido, *Populus alba* × *Populus tremula* o variante del mismo, o

(E) en las que las células son células bacterianas Gram-positivas, células de *Streptomyces*, células bacterianas Gram-negativas, células de *Escherichia* o células de *Pantoea*, o

(F) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH, en las que opcionalmente el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*, o

(G) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, o

(H) en las que la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno en las que la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfotransacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno, o

(I) en las que la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno, en el que la expresión del gen de lactato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

(J) en las que la malato deshidrogenasa es una malato deshidrogenasa dependiente de NADP y en las que la actividad de la malato deshidrogenasa dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP, en las que el gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP es un gen endógeno, y en las que expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético, o

(K) en las que las células comprenden además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de malato deshidrogenasa dependiente de NADP, o

(L) en las que la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa y en las que la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno, en las que el uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos, y en las que la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos, o

(M) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del complejo de piruvato deshidrogenasa del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa, en las que opcionalmente la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno; o

(N) en las que la actividad de PGL se modula atenuando la actividad de un gen de PGL endógeno, en las que la actividad de PGL se atenúa reemplazando el promotor del gen de PGL endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, y/o en las que la actividad de una PGL endógeno se atenúa mediante delección del gen de PGL endógeno; u

(O) en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno, en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se atenúa reemplazando el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, y/o en las que la actividad de una fosfoenolpiruvato carboxilasa endógena se atenúa mediante delección del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno, o

(P) que comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de difosfato de isopentenilo delta-isomerasa (IDI).

[3] Las células bacterianas de

(i) [1] o [2](H), en las que las células producen cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato

cinasa endógeno; o

(ii) [1] o [2](I), en las que las células producen cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

(iii) [2](J), en las que las células producen cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP; o

(iv) uno cualquiera de [1], [2](L) o [2](M), en las que las células producen cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula.

[4] Las células bacterianas de

(i) uno cualquiera de [1], [2](F) o [2](G), en las que la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa; o

(ii) uno cualquiera de [1], [2](A), [2](B), [2](C), [2](D), [2](E), [2](H) o [3](i), en las que la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o

(iii) uno cualquiera de [1], [2](I) o [3](ii), en las que la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

(iv) uno cualquiera de [2](J) o [3](iii), en las que el aumento de la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP aumentada; o

(v) uno cualquiera de [1], [2](L) o [2](M) o [3](iv), en las que la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada.

[5] Células bacterianas recombinantes capaces de dar una producción aumentada de mevalonato en las que las células se modifican por ingeniería genética mediante modulación de la actividad citrato sintasa para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato de manera que la actividad de citrato sintasa se disminuye, y en las que la actividad de las siguientes enzimas:

(a) fosfotransacetilasa

(b) acetato cinasa, y

(c) lactato deshidrogenasa,

se modula,

y en las que opcionalmente la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en:

(d) malato deshidrogenasa,

(e) piruvato deshidrogenasa,

(f) fosfogluconolactonasa (PGL), y

(g) fosfoenolpiruvato carboxilasa

se modula, y en las que dichas células comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de mevalonato (MVA) superior; y en las que las células producen cantidades aumentadas de mevalonato en comparación con células productoras de mevalonato que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia mevalonato.

[6] Las células bacterianas de [5],

- (A) en las que dichos uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la ruta de mevalonato (MVA) superior son un gen *mvaE* y un gen *mvaS*; o
- 5 (B) en las que el gen *mvaE* y el gen *mvaS* se seleccionan del grupo que consiste en: (a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *L. grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecalis*; o
- 10 (C) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH, en las que opcionalmente el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*; o
- (D) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético; o
- 15 (E) en las que la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno en las que la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfotransacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno; o
- 20 (F) en las que la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno, en las que la expresión del gen de lactato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o
- 25 (G) en las que la malato deshidrogenasa es una malato deshidrogenasa dependiente de NADP y en las que la actividad de la malato deshidrogenasa dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP, en las que el gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP es un gen endógeno, y en las que la expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético; o
- 30 (H) en las que las células comprenden además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de malato deshidrogenasa dependiente de NADP; o
- 35 (I) en las que la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa y en las que la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno, en las que la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno, o en las que el uno o más genes del complejo
- 40 de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos, y en las que la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos; o
- 45 (J) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del complejo de piruvato deshidrogenasa del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa; o
- 50 (K) en las que la actividad de PGL se modula atenuando la actividad de un gen de PGL endógeno, en las que la actividad de PGL se atenúa reemplazando el promotor del gen de PGL endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, o en las que la actividad de una PGL endógeno se atenúa mediante delección del gen de PGL endógeno; o
- (L) en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno, en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se atenúa reemplazando el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, o en las que la actividad de una fosfoenolpiruvato carboxilasa endógena se atenúa mediante delección del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno.
- 55 [7] Las células bacterianas de
- 60 (i) [5] o [6](E), en las que las células producen cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o
- 65 (ii) [5] o [6](F), en las que las células producen cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

(iii) [6](G), en las que las células producen cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP;
o

5 (iv) uno cualquiera de [5], [6](I) o [6](J), en las que las células producen cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula.

[8] Las células bacterianas de

10 (i) uno cualquiera de [5] o [6](C), en las que la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa; o

15 (ii) uno cualquiera de [5], [6](A), [6](B), [6](E) o [7](i), en las que la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o

20 (iii) uno cualquiera de [5], [6](F) o [7](ii), en las que la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno;
o

25 (iv) uno cualquiera de [6](G) o [7](iii), en las que el aumento de la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP aumentada; o

30 (v) uno cualquiera de [5], [6](I), [6](J) o [7](iv), en las que la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada.

35 [9] Células bacterianas recombinantes capaces de dar una producción aumentada de isoprenoides en las que las células se modifican por ingeniería genética mediante modulación de la actividad citrato sintasa para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato, de manea que la actividad de citrato sintasa se disminuye, y en las que la actividad de las siguientes enzimas:

40 (a) fosfotransacetilasa

(b) acetato cinasa, y

(c) lactato deshidrogenasa,

45 se modula, y

en las que opcionalmente la actividad de una o más enzimas del grupo:

50 (d) malato deshidrogenasa,

(e) piruvato deshidrogenasa

(f) fosfogluconolactonasa (PGL), y

55 (g) fosfoenolpiruvato carboxilasa

se modula, y en las que dichas células comprenden además (i) uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de mevalonato (MVA) y (ii) uno o más ácidos nucleicos que codifican poliprenil pirofosfato sintasas; y en las que las células producen cantidades aumentadas de isoprenoides en comparación con células productoras de isoprenoides que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia mevalonato.

[10] Las células bacterianas de [9],

65 (A) en las que el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA superior, en las que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA superior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos

- nucleicos de AA-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa, en las que opcionalmente dichos uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la ruta de mevalonato (MVA) superior son un gen *mvaE* y un gen *mvaS*, y en las que además opcionalmente el gen *mvaE* y el gen *mvaS* se seleccionan del grupo que consiste en:
- 5 (a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *L. grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecalis*; o
- (B) en las que el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA inferior, en las que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA inferior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de MVK, PMK y MVD, en las que opcionalmente la MVK se selecciona del grupo que consiste en mevalonato cinasa de *M. mazei*, polipéptido de mevalonato cinasa de *M. burtonii*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus sakei*, polipéptido de mevalonato cinasa de levadura, polipéptido de mevalonato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus pneumoniae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* y polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* CL190; o
- 10 (C) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de DXP; o
- 15 (D) en las que las células son células bacterianas Gram-positivas, células de *Streptomyces*, células bacterianas Gram-negativas, células de *Escherichia* o células de *Pantoea*; o
- (E) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH, en las que opcionalmente el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*; o
- 20 (F) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético; o
- 25 (G) en las que la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno, en las que la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfotransacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno; o
- 30 (H) en las que la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno, en las que la expresión del gen de lactato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o
- 35 (I) en las que la malato deshidrogenasa es una malato deshidrogenasa dependiente de NADP y en las que la actividad del malato deshidrogenasa dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP, en las que el gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP es un gen endógeno, y en las que la expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético; o
- 40 (J) en las que las células comprenden además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de malato deshidrogenasa dependiente de NADP; o
- 45 (K) en las que la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa y en las que la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno, en las que el uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos, y en las que la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos; o
- 50 (L) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del complejo de piruvato deshidrogenasa del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa, en las que opcionalmente la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno; o
- 55 (M) en las que la actividad de PGL se modula atenuando la actividad de un gen de PGL endógeno, en las que la actividad de PGL se disminuye reemplazando el promotor del gen de PGL endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, en las que la actividad de una PGL se atenúa mediante delección del gen de PGL endógeno; o
- 60 65

- (N) en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno, en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se disminuye reemplazando el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, y en las que la actividad de una fosfoenolpiruvato carboxilasa endógena se atenúa mediante delección del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno; u
- (O) que comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de difosfato de isopentenilo delta-isomerasa (IDI).
- [11] Las células bacterianas de
- (i) [9] o [10](G), en las que las células producen cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o
- (ii) uno cualquiera de [9] y [10](H), en las que las células producen cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o
- (iii) [10](I), en las que las células producen cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP; o
- (iv) uno cualquiera de [9], [10](K) o [10](L), en las que las células producen cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula.
- [12] Las células bacterianas de
- (i) uno cualquiera de [9], [10](E) o [10](F), en las que la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa; o
- (ii) uno cualquiera de [9], [10](A), [10](B), [10](C), [10](D), [10](G) o [11](i), en las que la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o
- (iii) uno cualquiera de [9], [10](H) u [11](ii), en las que la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o
- (iv) uno cualquiera de [10](I) u [11](iii), en las que el aumento de la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP aumentada; o
- (v) uno cualquiera de [9], [10](K), [10](L) u [11](iv), en las que la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada.
- [13] Las células bacterianas de uno cualquiera de [9]-[12], en las que el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos y politerpenos, en las que opcionalmente el isoprenoide es un sesquiterpeno, o en las que opcionalmente el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en abietadieno, amorfadieno, careno, α -farneseno, β -farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, patchulol, β -pineno, sabineno, γ -terpineno, terpindeno y valenceno.
- [14] Un método de (i) producción de isopreno, que comprende: (a) cultivar las células bacterianas de uno cualquiera de [1]-[4] en condiciones de cultivo adecuadas para la producción de isopreno; y (b) producir el isopreno; o (ii) producción de mevalonato, que comprende: (a) cultivar las células bacterianas de uno cualquiera de [5]-[8] en condiciones de cultivo adecuadas para la producción de mevalonato; y (b) producir el mevalonato; o (iii) producción de isoprenoides, que comprende: (a) cultivar las células bacterianas de uno cualquiera de [9]-[13] en condiciones de cultivo adecuadas para la producción de isoprenoides; y (b) producir los isoprenoides;

comprendiendo el método además opcionalmente (c) recuperar isopreno, mevalonato o isoprenoides, respectivamente.

5 Por consiguiente, en un aspecto de la divulgación, se proporcionan en el presente documento células capaces de una producción aumentada de isopreno en las que las células se modifican por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de isopreno de manera que la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en: citrato sintasa, fosfotransacetilasa, acetato cinasa, lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, fosfogluconolactonasa (PGL) y fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula, y en las que dichas células comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de mevalonato (MVA) y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa; y en las que dichas células producen cantidades aumentadas de isopreno en comparación con células productoras de isopreno que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia isopreno. En algunos aspectos, el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA superior, en los que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA superior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de AA-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa. En algunos aspectos, dichos uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la ruta de mevalonato (MVA) superior son un gen *mvaE* y un gen *mvaS*. En algunos aspectos, el gen *mvaE* y el gen *mvaS* se seleccionan del grupo que consiste en: (a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *L. grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecalis*. En algunos aspectos, el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA inferior, en los que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA inferior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de MVK, PMK y MVD. En algunos aspectos, la MVK se selecciona del grupo que consiste en mevalonato cinasa de *M. mazei*, polipéptido de mevalonato cinasa de *M. burtonii*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus sakei*, polipéptido de mevalonato cinasa de levadura, polipéptido de mevalonato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus pneumoniae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* y polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* CL190. En algunos aspectos, las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de DXP. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido de *Pueraria* o *Populus* o un híbrido, *Populus alba* × *Populus tremula* o variante del mismo. En algunos aspectos, las células son células bacterianas Gram-positivas, células de *Streptomyces*, células bacterianas Gram-negativas, células de *Escherichia*, células de *Pantoea*, células fúngicas, células fúngicas filamentosas, células de *Trichoderma*, células de *Aspergillus* o células de levadura. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula disminuyendo la actividad de un gen de citrato sintasa endógeno. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH. En algunos aspectos, el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa. En algunos aspectos, la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfotransacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de lactato deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de lactato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos, la actividad de malato deshidrogenasa dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos, el gen de malato deshidrogenasa dependiente de

NADP es un gen endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células comprenden además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, el aumento de la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP aumentada. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de piruvato deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, el uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos. En algunos aspectos, la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfogluconolactonasa (PGL). En algunos aspectos, la actividad de PGL se modula atenuando la actividad de un gen de PGL endógeno. En algunos aspectos, la actividad de PGL se atenúa reemplazando el promotor del gen de PGL endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En algunos aspectos, la actividad de una PGL endógena se atenúa mediante delección del gen de PGL endógeno. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa. En algunos aspectos, la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno. En algunos aspectos, la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se atenúa reemplazando el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En algunos aspectos, la actividad de una fosfoenolpiruvato carboxilasa endógena se atenúa mediante delección del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno. En algunos aspectos, las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de difosfato de isopentenilo delta-isomerasa (IDI).

En otros aspectos de la divulgación, se proporcionan en el presente documento métodos para producir isopreno, que comprenden: (a) cultivar cualquiera de las células proporcionada por cualquiera de los aspectos divulgados en el presente documento en condiciones de cultivo adecuadas para la producción de isopreno; y (b) producir el isopreno. En otra realización, el método comprende además recuperar el isopreno.

En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan en el presente documento células recombinantes capaces de una producción aumentada de mevalonato en las que las células se modifican por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato de manera que la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en citrato sintasa, fosfotransacetilasa, acetato cinasa, lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, fosfogluconolactonasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula y en las que dichas células comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de mevalonato (MVA) superior; y en las que las células producen cantidades aumentadas de mevalonato en comparación con células productoras de mevalonato que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia mevalonato. En algunos aspectos, dichos uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la ruta de mevalonato (MVA) superior son un gen *mvaE* y un gen *mvaS*. En algunos aspectos, el gen *mvaE* y el gen *mvaS* se seleccionan del grupo que consiste en: (a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *L. grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecalis*. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula disminuyendo la actividad de un gen de citrato sintasa endógeno. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH. En algunos aspectos, el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*. En algunos aspectos, la

actividad de citrato sintasa se modula reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa. En algunos aspectos, la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfotransacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de lactato deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de lactato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos, la actividad de malato deshidrogenasa dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos, el gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP es un gen endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células comprenden además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, en los que las células producen cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, en los que el aumento de la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP aumentada. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de piruvato deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, el uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos. En algunos aspectos, la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfogluconolactonasa (PGL). En algunos aspectos, la actividad de PGL se modula atenuando la actividad de un gen de PGL endógeno. En algunos aspectos, la actividad de PGL se atenúa reemplazando el promotor del gen de PGL endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En algunos aspectos, la actividad de una PGL endógena se atenúa mediante delección del gen de PGL endógeno. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa. En algunos aspectos, la actividad de

fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno. En algunos aspectos, la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se atenúa reemplazando el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En algunos aspectos, la actividad de una fosfoenolpiruvato carboxilasa endógena se atenúa mediante delección del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, se aumenta la producción de mevalonato en comparación con microorganismos que no se hacen crecer en condiciones de actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), en los que el flujo de carbono metabólico en las células se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en (a) citrato sintasa, (b) fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa, (c) lactato deshidrogenasa, (d) malato deshidrogenasa y (e) complejo de piruvato descarboxilasa. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la actividad de citrato sintasa se modula reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno y la actividad de acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de acetato cinasa endógeno.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporcionan en el presente documento métodos para producir mevalonato, que comprenden: (a) cultivar cualquiera de las células proporcionadas por cualquiera de los aspectos divulgados en el presente documento en condiciones de cultivo adecuadas para la producción de isopreno; y (b) producir el mevalonato. En una realización, el método comprende además recuperar el mevalonato.

En aún otros aspectos de la divulgación, se proporcionan en el presente documento células recombinantes capaces de dar una producción aumentada de isoprenoides en las que las células se modifican por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato de manera que la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en: citrato sintasa, fosfotransacetilasa, acetato cinasa, lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, fosfogluconolactonasa (PGL) y fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula y en las que dichas células comprenden además (i) uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de mevalonato (MVA) y (ii) uno o más ácidos nucleicos que codifican poliprenil pirofosfato sintasas; y en las que las células producen cantidades aumentadas de isoprenoides en comparación con células productoras de isoprenoides que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia mevalonato. En algunos aspectos, el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA superior, en los que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA superior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de AA-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa. En algunos aspectos, dichos uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la ruta de mevalonato (MVA) superior son un gen *mvaE* y un gen *mvaS*. En algunos aspectos, el gen *mvaE* y el gen *mvaS* se seleccionan del grupo que consiste en: (a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *L. grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecalis*. En algunos aspectos, el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA inferior, en los que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA inferior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de MVK, PMK y MVD. En algunos aspectos, la MVK se selecciona del grupo que consiste en mevalonato cinasa de *M. mazei*, polipéptido de mevalonato cinasa de *M. burtonii*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus sakei*, polipéptido de mevalonato cinasa de levadura, polipéptido de mevalonato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus pneumoniae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* y polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* CL190. En algunos aspectos, las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de DXP. En algunos aspectos, las células son células bacterianas Gram-positivas, células de *Streptomyces*, células bacterianas Gram-negativas, células de *Escherichia*, células de *Pantoea*, células fúngicas, células fúngicas filamentosas, células de *Trichoderma*, células de *Aspergillus* o células de levadura. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula disminuyendo la actividad de un gen de citrato sintasa endógeno. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH. En algunos aspectos, el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa. En algunos aspectos, la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfotransacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la

5 atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de lactato deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de lactato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos, la actividad de malato deshidrogenasa dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos, el gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP es un gen endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células comprenden además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células producen cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, el aumento de la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP aumentada. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de piruvato deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, el uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos. En algunos aspectos, la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la célula produce cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfogluconolactonasa (PGL). En algunos aspectos, la actividad de PGL se modula atenuando la actividad de un gen de PGL endógeno. En algunos aspectos, la actividad de PGL se disminuye reemplazando el promotor del gen de PGL endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En algunos aspectos, la actividad de una PGL endógena se atenúa mediante delección del gen de PGL endógeno. En algunos aspectos, el flujo de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa. En algunos aspectos, la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno. En algunos aspectos, la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se disminuye reemplazando el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En algunos aspectos, la actividad de una fosfoenolpiruvato carboxilasa endógena se atenúa mediante delección del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno. En algunos aspectos de cualquiera de los aspectos proporcionados en el presente documento, en los que el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sequiterpenos y politerpenos. En algunos aspectos, el isoprenoide es un sesquiterpeno. En algunos aspectos, el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en abietadieno, amorfadieno, careno, α -farneseno, β -farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, patchulol, β -pineno, sabineno, γ -terpineno, terpendeno y valenceno. En algunos aspectos, las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de difosfato de isopentenilo delta-isomerasa (IDI).

En otros aspectos, se proporciona en el presente documento un método para producir isoprenoides, que comprende: (a) cultivar cualquiera de las células proporcionadas por cualquiera de los aspectos divulgados en el presente documento en condiciones de cultivo adecuadas para la producción de isoprenoides; y (b) producir los isoprenoides. En un aspecto, el método comprende además recuperar los isoprenoides.

En un aspecto, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante, o progenie del mismo, que comprende células modificadas por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato en el que la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en: (a) citrato sintasa, (b) fosfotransacetilasa; (c) acetato cinasa; (d) lactato deshidrogenasa; (e) enzima málica dependiente de NAD, y; (f) piruvato deshidrogenasa se modula. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, las células pueden comprender además un gen *mvaE* y un gen *mvaS* (tales como un gen *mvaE* y un gen *mvaS* seleccionados del grupo que consiste en: (a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *L. grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecalis*).

En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante, o progenie del mismo, en el que el flujo aumentado de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de citrato sintasa. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula disminuyendo la actividad de un gen de citrato sintasa endógeno. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH. En algunos aspectos, el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa.

En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante, o progenie del mismo, en el que el flujo aumentado de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa. En algunos aspectos, la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno. En un aspecto, la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfotransacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el microorganismo recombinante produce cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno.

En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante, o progenie del mismo, en el que el flujo aumentado de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de lactato deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de lactato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el microorganismo recombinante produce cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno.

En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante, o progenie del mismo, en el que el flujo aumentado de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de enzima málica dependiente de NADP. En algunos aspectos, la actividad de enzima málica dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de enzima málica dependiente de NADP. En algunos aspectos, el gen de enzima málica dependiente de NADP es un gen endógeno. En algunos aspectos, la expresión del gen de enzima málica dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de enzima málica dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético. En algunos aspectos, el microorganismo recombinante comprende además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de enzima málica dependiente de NADP. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el microorganismo recombinante produce cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de enzima málica dependiente de NADP. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el aumento de la actividad de un gen de enzima málica dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato

en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen enzima málica dependiente de NADP aumentada.

5 En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante, o progenie del mismo, en el que el flujo aumentado de carbono se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de piruvato deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno. En algunos aspectos, el uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos. En algunos aspectos, la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos. En algunos aspectos, el microorganismo recombinante comprende además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa. En algunos aspectos, la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el microorganismo recombinante produce cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula. En cualquier aspecto en el presente documento, la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada.

25 En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante en el que la producción de mevalonato se aumenta en comparación con microorganismos que no se han modificado por ingeniería genética en una o más enzimas del grupo que consiste en (a) citrato sintasa, (b) fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa, (c) lactato deshidrogenasa, (d) enzima málica dependiente de NADP y (e) complejo de piruvato descarboxilasa para el aumento del flujo de carbono hacia la producción de mevalonato.

30 En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante en el que la producción de mevalonato se aumenta en comparación con microorganismos que no se hacen crecer en condiciones de actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), en el que el flujo de carbono metabólico en el microorganismo recombinante se dirige hacia la producción de mevalonato modulando la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en (a) citrato sintasa, (b) fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa, (c) lactato deshidrogenasa, (d) enzima málica y (e) complejo de piruvato descarboxilasa.

35 En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante en el que el microorganismo recombinante se selecciona del grupo que consiste en levaduras, bacterias, hongos filamentosos, algas y cianobacterias. En algunos aspectos, el microorganismo recombinante es *E. coli*. En algunos aspectos, el microorganismo recombinante es una levadura.

40 En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la divulgación proporciona un microorganismo recombinante en el que la actividad de citrato sintasa se modula reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno y la actividad de acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de acetato cinasa endógeno.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de producción de mevalonato usando cualquiera de los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento.

50 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de producción de isopreno usando cualquiera de los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de producción de precursores de isoprenoides usando cualquiera de los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento.

60 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de producción de isoprenoides usando cualquiera de los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 representa un gráfico que muestra el rendimiento en masa de mevalonato a partir de glucosa. Las barras de error representan una desviación estándar de dos réplicas.

La figura 2 representa un mapa de plásmido de pDW34.

- La figura 3 representa una inmunotransferencia de tipo Western en donde se visualiza MvaE a partir de la cepa DW326. Carril 1 - marcador de referencia, 2-0,4 ug de MvaE purificado, 3-7, muestras de lisado de la cepa DW326 inducida con IPTG 0, 25, 50, 100, 200 uM.
- 5 La figura 4 representa un gel de SDS-PAGE teñido con Safestain que contiene: Carril 1 - marcador de referencia, 2-15 - purificación mediada por etiqueta de His de fracciones de proteína MvaE eluidas a partir de una columna de níquel.
- 10 La figura 5 representa el metabolismo central de *E. coli*. Se muestran las enzimas citrato sintasa (*gltA*), fosfotransacetilasa (*pta*), acetato cinasa (*ackA*), lactato deshidrogenasa (*ldhA*), enzima málica dependiente de NADP⁺ (*maeb*) y el complejo de piruvato deshidrogenasa (*Pdh*).
- 15 La figura 6 representa la actividad citrato sintasa de las cepas MD09-314, CMP451, CMP452 y CMP453.
- La figura 7 representa la curva de crecimiento de las cepas CMP694, CMP678, CMP680, CMP736 y CMP832. Se añadió IPTG 100 uM a t = 2. La absorbancia a 600 nm se representa gráficamente en función del tiempo (EFT = tiempo de fermentación transcurrido (h)).
- 20 La figura 8 representa la concentración de mevalonato (g/l) tal como se obtiene a partir de glucosa 10 g/l tras la fermentación en matraz de agitación de las cepas CMP694, CMP832, CMP678, CMP680 y CMP736.
- La figura 9 representa el contexto de genoma local del gen *maeB* en *E. coli* BL21.
- 25 La figura 10 representa el contexto de genoma local del complejo de piruvato deshidrogenasa (*pdhR-aceEF-ldp*) en *E. coli* K-12.
- La figura 11 representa la inserción de un promotor PL.6 en el sentido de 5' del gen *aceE*.
- 30 La figura 12 representa un diseño de construcción para la inserción de un promotor PL.6 en el sentido de 5' del gen *aceE*.
- La figura 13 representa la curva de crecimiento de las cepas CMP678, MD10-555, CMP711 y CMP729. Se añadió IPTG 100 uM a t = 2. La absorbancia a 600 nm se representa gráficamente en función del tiempo (EFT = tiempo de fermentación transcurrido (h)).
- 35 La figura 14 representa la concentración de mevalonato (g/l) tal como se obtiene a partir de glucosa 10 g/l tras la fermentación en matraz de agitación de las cepas CMP678, MD1-555, CMP711 y CMP729.
- 40 La figura 15 representa el rendimiento de isopreno sobre glucosa de la cepa 1.2 *gltA* (cuadrados blancos) en comparación con la cepa original (rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. Se calculó el rendimiento global usando la siguiente fórmula: % en peso de rendimiento sobre glucosa = $\frac{\text{Isopreno total}(t)}{[\text{P de alimentación}(0) - \text{P de alimentación}(t) + 50] * 0,57}$, en donde 0,57 es el % en peso de glucosa en la disolución de alimentación de glucosa y 50 son los gramos de esta alimentación discontinua al fermentador a t = 0. (20100278: cepa CMP457 (cuadrados blancos); G11.2*gltA*20100131: cepa MD09-317 (rombos negros) *gltA wt*).
- 45 La figura 16 representa el título de la cepa 1.2 *gltA* (cuadrados blancos) en comparación con la cepa original (rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100278: cepa CMP457 (cuadrados blancos); G11.2*gltA* 20100131: cepa MD09-317 (rombos negros) *gltA wt*).
- 50 La figura 17 representa la productividad volumétrica de la cepa 1.2 *gltA* (cuadrados blancos) en comparación con la cepa original (rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100278: cepa CMP457 (cuadrados blancos); G11.2*gltA*20100131: cepa MD09-317 (rombos negros) *gltA wt*).
- 55 La figura 18 representa el índice de productividad celular para isopreno de la cepa 1.2 *gltA* (cuadrados blancos) en comparación con la cepa original (rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100278: cepa CMP457 (cuadrados blancos); G11.2*gltA*20100131: cepa MD09-317 (rombos negros) *gltA wt*). Índice de rendimiento celular (CPI): g de isopreno/gDCW prom. = $\frac{[\text{HG Total} / (\text{DO} * \text{Ferm Wt} / 1,05) / 2,7]}{2,7}$ en donde 1,05 es el peso específico del caldo de fermentación supuesto (kg/l), y 2,7 tiene unidades de DO*L/gDCW.
- 60 La figura 19 representa el rendimiento de mevalonato sobre glucosa de la cepa 1.2 *gltA* (cuadrados blancos) en comparación con la original (rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se ejecutaron las
- 65

5 cepas en las mismas condiciones. (20100916: cepa CMP678 (cuadrados blancos); G11.2gltA (20100154: cepa MCM1002 (rombos negros) gltA wt). Se calculó el rendimiento global usando la siguiente fórmula: % en peso de rendimiento sobre glucosa = $\frac{\text{Mevalonato total}(t)}{[(P \text{ de alimentación}(0) - P \text{ de alimentación}(t) + 50) * 0,59]}$, en donde 0,59 es la fracción en peso de glucosa en la disolución de alimentación de glucosa y 50 son los gramos de esta alimentación discontinua al fermentador a $t = 0$.

10 La figura 20 representa el índice de productividad celular (CPI) de mevalonato sobre glucosa de la cepa 1.2 gltA (cuadrados blancos) en comparación con la original (rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. El peso celular seco no se midió directamente en estos experimentos, más bien, se usó un factor de conversión de densidad óptica determinada experimentalmente en peso celular seco. Este factor de DO en DCW se generó en un huésped de *E. coli* BL21 similar en la misma formulación de medio. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100916: cepa CMP678 (cuadrados blancos); G11.2gltA (20100154: cepa MCM1002 (rombos negros) gltA wt).

15 La figura 21 representa la productividad volumétrica de mevalonato de la cepa 1.2 gltA cepa (cuadrados blancos) en comparación con la original (rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100916: cepa CMP678 (cuadrados blancos); G11.2gltA (20100154: cepa MCM1002 (rombos negros) gltA wt).

20 La figura 22 representa el título de caldo de mevalonato en la cepa 1.2 gltA (cuadrados blancos) en comparación con la original (rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100916: cepa CMP678 (cuadrados blancos); G11.2gltA (20100154: cepa MCM1002 (rombos negros) gltA wt).

25 La figura 23 representa el índice de productividad celular (CPI) de mevalonato sobre glucosa de la cepa 1.2 gltA (cuadrados blancos) en comparación con la original (rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. El peso celular seco no se midió directamente en estos experimentos, más bien, se usó un factor de conversión de densidad óptica determinada experimentalmente en peso celular seco. Este factor de DO en DCW se generó en un huésped de *E. coli* BL21 similar en la misma formulación de medio. Las cepas en el gráfico más adelante se ejecutaron en las mismas condiciones. (20100967: cepa CMP680 (triángulos blancos) ackA, pta-, ldh-G11.2gltA; 20100916: cepa CMP678 (cuadrados blancos) G11.2gltA; 20100154: cepa MCM1002 (rombos negros) gltA wt).

35 La figura 24 representa el rendimiento de mevalonato sobre glucosa del huésped "triple" (CMP680, triángulos blancos) que es mejor a las 36 h en comparación con la cepa 1.2 gltA (CMP678, cuadrados blancos) y ambas están muy mejoradas con respecto a la original (MCM1002, rombos negros) en la fermentación de 15 l. La cepa CMP680 es notable por su alto rendimiento inicial. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100967: cepa CMP680 (triángulos blancos) ackA, pta-, ldh-G11.2gltA; 20100916: cepa CMP678 (cuadrados blancos) G11.2gltA; 20100154: cepa MCM1002 (rombos negros) gltA wt).

40 La figura 25 representa la productividad específica de mevalonato notificada en cuanto a miligramos de mevalonato por litro de caldo de fermentador por hora por unidad de densidad óptica (absorbancia a 550 nm). El huésped "triple" (CMP680, triángulos blancos) muestra una productividad específica mucho más alta desde las 0 hasta las 20 h de EFT en comparación con la cepa 1.2 gltA (CMP678, cuadrados blancos) y ambas están mejoradas con respecto a la original (MCM1002, rombos negros) en la fermentación de 15 l. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100967: cepa CMP680 (triángulos blancos) ackA, pta-, ldh-G11.2gltA; 20100916: cepa CMP678 (cuadrados blancos) G11.2gltA; 20100154: cepa MCM1002 (rombos negros) gltA wt).

50 La figura 26 representa la productividad volumétrica de mevalonato notificada en cuanto a gramos de mevalonato por litro de caldo de fermentador por hora de tiempo de fermentación transcurrido. El huésped "triple" (CMP680, triángulos blancos) muestra una productividad volumétrica inferior en comparación con la cepa 1.2 gltA (CMP678, cuadrados blancos) pero ambas están mejoradas con respecto a la original (MCM1002, rombos negros) en la fermentación de 15 l. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100967: cepa CMP680 (triángulos blancos) ackA, pta-, ldh-G11.2gltA; 20100916: cepa CMP678 (cuadrados blancos) G11.2gltA; 20100154: cepa MCM1002 (rombos negros) gltA wt).

55 La figura 27 representa el título de caldo de mevalonato (o concentración en caldo de mevalonato) que era mayor en la cepa 1.2 gltA (CMP678, cuadrados blancos) en comparación con el huésped "triple" (CMP680, triángulos blancos). Ambos eran mayores que el control original (MCM1002, rombos negros) en la fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se ejecutaron las cepas en las mismas condiciones. (20100967: cepa CMP680 (triángulos blancos) ackA, pta-, ldh-G11.2gltA; 20100916: cepa CMP678 (cuadrados blancos) G11.2gltA; 20100154: cepa MCM1002 (rombos negros) gltA wt).

60 La figura 28 representa la solubilidad de mevalonato cinasas (MVK) de *M. burtonii* y *M. mazei* en las cepas MCM1666 y MCM1669 respectivamente.

65 La figura 29 representa el crecimiento y la productividad de isopreno en las cepas de *E. coli* modificadas por

ingeniería genética que expresan mevalonato cinasa de *M. burtonii* (A) o mevalonato cinasa de *M. mazei* (B) en el cromosoma de *E. coli* a pequeña escala.

5 La figura 30 representa la expresión de mevalonato cinasas de *M. mazei* y *M. burtonii* en fermentaciones de 15 l de *E. coli*.

10 La figura 31 representa el rendimiento de isopreno sobre glucosa logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. % en peso de rendimiento sobre glucosa = $\text{Isopreno total (t)} / [(\text{P de alimentación(0)} - \text{P de alimentación(t)} + 83,5) * 0,59]$, en donde 0,59 es el % en peso de glucosa en la disolución de alimentación de glucosa y 83,5 son los gramos de esta alimentación discontinua al fermentador a $t = 0$. Cada alimentación tenía su % en peso medido independientemente. DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos negros); DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos blancos); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos negros); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos).

15 La figura 32 representa el rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó el rendimiento instantáneo de isopreno usando la fórmula: Rendimiento inst. de isopreno (% g/g) = $\text{Isopreno producido (t}_1\text{-t}_0\text{)} / \text{glucosa consumida (t}_1\text{-t}_0\text{)} * 100$. DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos negros); DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos blancos); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos negros); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos).

20 La figura 33 representa índice de productividad celular (CPI) logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó el índice de productividad celular (CPI) usando la siguiente fórmula: $\text{CPI} = \text{gramos totales de isopreno} / \text{gramos totales de peso celular seco}$. DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos negros); DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos blancos); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos negros); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos).

25 La figura 34 representa la productividad volumétrica lograda en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó la productividad volumétrica usando la siguiente fórmula: $[\Sigma \text{HGER(t)} / 1000 * 68,117] / [t - t_0]$, en donde la suma es de desde t_0 hasta t . El tiempo de respuesta del tanque no está factorizado. DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos negros); DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos blancos); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos negros); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos).

30 La figura 35 representa la productividad específica lograda en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó la productividad específica usando la siguiente fórmula: $\text{productividad específica (mg/l/h/DO)} = \text{HgER} * 68,117 \text{ g/mol/DO}$. HgER es la velocidad de desarrollo de isopreno en (mmol/l/h). DO = densidad óptica = $\text{Absorbancia a } 550 \text{ nm} * \text{factor de dilución en agua}$. DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos negros); DW708: MVK de *mazei* en plásmido y cromosoma (rombos blancos); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos negros); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos).

35 La figura 36 representa el rendimiento de isopreno sobre glucosa logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. % en peso de rendimiento sobre glucosa = $\text{Isopreno total (t)} / [(\text{P de alimentación(0)} - \text{P de alimentación(t)} + 83,5) * 0,59]$, en donde 0,59 es el % en peso de glucosa en la disolución de alimentación de glucosa y 83,5 son los gramos de esta alimentación discontinua al fermentador a $t = 0$. Cada alimentación tenía su % en peso medido independientemente. MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos negros); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos); MCM2126: MVK de *mazei* en cromosoma solo (cuadrados negros); MCM2127: MVK de *mazei* en cromosoma solo (estrellas).

40 La figura 37 representa el rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó el rendimiento instantáneo de isopreno usando la fórmula: Rendimiento inst. de isopreno (% g/g) = $\text{Isopreno producido (t}_1\text{-t}_0\text{)} / \text{glucosa consumida (t}_1\text{-t}_0\text{)} * 100$. MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos negros); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos); MCM2126: MVK de *mazei* en cromosoma solo (cuadrados negros); MCM2127: MVK de *mazei* en cromosoma solo (estrellas).

45 La figura 38 representa el índice de productividad celular (CPI) logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó el índice de productividad celular (CPI) usando la siguiente fórmula: $\text{CPI} = \text{gramos totales de isopreno} / \text{gramos totales de peso celular seco}$. MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos negros); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos); MCM2126: MVK de *mazei* en cromosoma solo (cuadrados negros); MCM2127: MVK de *mazei* en cromosoma solo (estrellas).

50 La figura 39 representa la productividad volumétrica lograda en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó la productividad volumétrica usando la siguiente fórmula: $[\Sigma \text{HGER(t)} / 1000 * 68,117] / [t - t_0]$, en donde la suma es de desde t_0 hasta t . El tiempo de respuesta del tanque no está factorizado. MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos negros); MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos);

MCM2126: MVK de *mazei* en cromosoma solo (cuadrados negros); MCM2127: MVK de *mazei* en cromosoma solo (estrellas).

5 La figura 40 representa la productividad específica lograda en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó la productividad específica usando la siguiente fórmula: productividad específica (mg/l/h/DO) = $HgER \cdot 68,117 \text{ g/mol/DO}$. HgER es la velocidad de desarrollo de isopreno en (mmol/l/h). DO = densidad óptica = Absorbancia a 550 nm * factor de dilución en agua. MCM2125: MVK de *burtonii* en cromosoma solo (triángulos blancos); MCM2126: MVK de *mazei* en cromosoma solo (cuadrados negros); MCM2127: MVK de *mazei* en cromosoma solo (estrellas).

10 La figura 41 representa el rendimiento de isopreno sobre glucosa logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. CMP1082 (pgl+) se representa mediante triángulos blancos y CMP1136 (pgl-) se representa mediante cuadrados negros.

15 La figura 42 representa el rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. CMP1082 (pgl+) se representa mediante triángulos blancos y CMP1136 (pgl-) se representa mediante cuadrados negros.

20 La figura 43 representa el índice de productividad celular (CPI) logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. CMP1082 (pgl+) se representa mediante triángulos blancos y CMP1136 (pgl-) se representa mediante cuadrados negros.

25 La figura 44 representa la productividad volumétrica lograda en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. CMP1082 (pgl+) se representa mediante triángulos blancos y CMP1136 (pgl-) se representa mediante cuadrados negros.

30 La figura 45 representa la productividad específica lograda en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. CMP1082 (pgl+) se representa mediante triángulos blancos y CMP1136 (pgl-) se representa mediante cuadrados negros.

La figura 46 representa la DO_{600} de cultivos productores de isopreno en función del tiempo, en un matraz de agitación Erlenmeyer de 250 ml, lleno de 25 ml de medio, e incubado a 34 °C y 200 rpm.

35 La figura 47 representa la productividad específica (en unidades arbitrarias) de cultivos productores de isopreno en función de la DO. Se incubaron los cultivos en un matraz de agitación Erlenmeyer de 250 ml, lleno de 25 ml de medio, a 34 °C y 200 rpm.

40 La figura 48 representa el rendimiento de isopreno sobre glucosa logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. % en peso de rendimiento sobre glucosa = $\frac{\text{Isopreno total (t)}}{[(P \text{ de alimentación}(0) - P \text{ de alimentación}(t) + 83,5) \cdot 0,59]}$, en donde 0,59 es el % en peso de glucosa en la disolución de alimentación de glucosa y 83,5 son los gramos de esta alimentación discontinua al fermentador a $t = 0$. Cada alimentación tenía su % en peso medido independientemente. CMP1136: promotor ppc de tipo natural (triángulos blancos); CMP1237: promotor G1.2ppc (cuadrados negros).

45 La figura 49 representa el rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó el rendimiento instantáneo de isopreno usando la fórmula: Rendimiento inst. de isopreno (%g/g) = $\frac{\text{Isopreno producido (t}_1 - t_0)}{\text{glucosa consumida (t}_1 - t_0)} \cdot 100$. CMP1136: promotor ppc de tipo natural (triángulos blancos); CMP1237: promotor G1.2ppc (cuadrados negros).

50 La figura 50 representa el índice de productividad celular (CPI) logrado en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó el índice de productividad celular (CPI) usando la siguiente fórmula: CPI = gramos totales de isopreno / gramos totales de peso celular seco. CMP1136: promotor ppc de tipo natural (triángulos blancos); CMP1237: promotor G1.2ppc (cuadrados negros).

55 La figura 51 representa la productividad volumétrica lograda en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó la productividad volumétrica usando la siguiente fórmula: $\frac{[\Sigma HGER(t) / 1000 \cdot 68,117]}{[t - t_0]}$, en donde la suma es de desde t_0 hasta t. El tiempo de respuesta del tanque no está factorizado. CMP1136: promotor ppc de tipo natural (triángulos blancos); CMP1237: promotor G1.2ppc (cuadrados negros).

60 La figura 52 representa la productividad específica lograda en cada fermentación de 15 l a lo largo del tiempo. Se calculó la productividad específica usando la siguiente fórmula: productividad específica (mg/l/h/DO) = $HgER \cdot 68,117 \text{ g/mol/DO}$. HgER es la velocidad de desarrollo de isopreno en (mmol/l/h). DO = densidad óptica = Absorbancia a 550 nm * factor de dilución en agua. CMP1136: promotor ppc de tipo natural (triángulos blancos); CMP1237: promotor G1.2ppc (cuadrados negros).

65 La figura 53 representa la organización del genoma de *E. coli* MG1655 alrededor de FNR (fuente: GenBank

U00096).

La figura 54 representa la DO_{600} de cultivos productores de isopreno en función del tiempo, en un matraz de agitación Erlenmeyer de 250 ml, lleno de 25 ml de medio, e incubado a 34 °C y 200 rpm.

5 La figura 55 representa la productividad específica (en unidades arbitrarias) de cultivos productores de isopreno en función de la DO. Se incubaron los cultivos en un matraz de agitación Erlenmeyer de 250 ml, llenos de 25 ml de medio, a 34 °C y 200 rpm.

10 La figura 56 representa la DO_{600} de cultivos productores de isopreno en función del tiempo, en un matraz de agitación Erlenmeyer de 250 ml, lleno de 25 ml de medio, e incubado a 34 °C y 50 rpm.

15 La figura 57 representa la productividad específica (en unidades arbitrarias) de cultivos productores de isopreno en función de la DO. Se incubaron los cultivos en un matraz de agitación Erlenmeyer de 250 ml, lleno de 25 ml de medio, a 34 °C y 50 rpm.

La figura 58 representa la DO_{600} de cultivos productores de isopreno en función del tiempo.

20 La figura 59 representa la productividad específica (en unidades arbitrarias) de cultivos productores de isopreno en función del tiempo.

La figura 60 representa la señal de hibridación de ARN sobre la forma de alineamiento CMP457 (que produce isopreno) frente a MCM1020 (cepa de control).

25 La figura 61 representa la DO_{600} de cultivos en función del tiempo.

La figura 62 representa la productividad específica (en unidades arbitrarias) de cultivos productores de isopreno en función del tiempo.

30 La figura 63 representa un mapa del plásmido pMCM1666-pET24-His-TEV-bMVK.

La figura 64 representa un mapa del plásmido pMCM1669-pET24-His-TEV-mMVK(GO).

35 La figura 65 representa un esquema del constructo de MVK de dos cistrones.

La figura 66 representa un mapa del plásmido pMCM2020-pTrcAlba-bMVK.

La figura 67 representa un mapa del plásmido pMCM2095-pTrcAlba-mMVK(del).

40 La figura 68 representa la DO_{600} de cultivos en función del tiempo.

La figura 69 representa la productividad específica (en unidades arbitrarias) de cultivos productores de isopreno en función del tiempo.

45 Descripción detallada

La divulgación proporciona, entre otras cosas, composiciones y métodos para la producción aumentada de mevalonato, isopreno, moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides en microorganismos recombinantes que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato. En un aspecto, la divulgación proporciona, entre otras cosas, microorganismos recombinantes, o una progenie de los mismos, que comprende células modificadas por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato, en los que la actividad de una o más enzimas o proteínas del grupo que consiste en: (a) citrato sintasa, (b) fosfotransacetilasa; (c) acetato cinasa; (d) lactato deshidrogenasa; (e) enzima mállica dependiente de NADP; (f) piruvato deshidrogenasa; (g) 6-fosfogluconolactonasa; (h) fosfoenolpiruvato carboxilasa; (i) el inhibidor de la actividad de RssB durante la proteína de privación de magnesio; (j) el componente *acrA* de la bomba de eflujo de múltiples fármacos *acrAB-TolC*; y (k) el ARNp de reducción de fumarato y nitrato (FNR) se modula. En un aspecto, los microorganismos recombinantes divulgados en el presente documento son células que se han modificado por ingeniería genética para expresar de manera heteróloga ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de MVA superior. En otro aspecto, los microorganismos recombinantes son células (tales como células bacterianas) que se han modificado por ingeniería genética para expresar de manera heteróloga polipéptidos codificados por los genes *mvaE* y *mvaS* (tales como genes *mvaE* y *mvaS* de los microorganismos *Listeria grayi*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* y/o *Enterococcus faecalis*). Se contempla que cualquier progenie del microorganismo recombinante también está dentro del alcance de la divulgación.

65 La ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato es particularmente importante para la producción de las moléculas

precursoras de isoprenoides difosfato de dimetilalilo (DMAPP) y pirofosfato de isopentenilo (IPP). Las enzimas de la ruta de mevalonato superior convierten acetil CoA, producida a partir de glucosa, en mevalonato mediante tres reacciones enzimáticas. Conjuntamente, genes de la ruta de MVA superior (por ejemplo, los genes *mvaE* y *mvaS*, tales como *mvaE* y *mvaS* de las especies bacterianas mencionadas anteriormente) codifican polipéptidos que presentan las actividades enzimáticas de la ruta de mevalonato superior. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que el aumento de la eficiencia y productividad de estas tres actividades enzimáticas en la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato superior aumentará sustancialmente las concentraciones intracelulares de mevalonato y, por consiguiente, de moléculas precursoras de isoprenoides posteriores tales como DMAPP e IPP. El rendimiento aumentado de la producción de mevalonato por estas cepas es, por tanto, ventajoso para aplicaciones comerciales.

Tal como se detalla en el presente documento, las rutas enzimáticas que incluyen citrato sintasa, fosfotransacetilasa, acetato cinasa, lactato deshidrogenasa, enzima málica y/o piruvato deshidrogenasa pueden modularse para aumentar o disminuir la actividad de enzimas en estas rutas de tal manera que se dirige más flujo de carbono hacia la producción de mevalonato. Otros factores cuya modulación puede aumentar el flujo de carbono hacia mevalonato en células, pueden incluir 6-fosfogluconolactonasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, el inhibidor de la actividad de RssB durante la proteína de privación de magnesio, el componente *acrA* de la bomba de eflujo de múltiples fármacos *acrAB-TolC* y el ARNp de reducción de fumarato y nitrato. Esto puede conducir, a su vez, a más sustrato para la producción de isopreno, precursores de isoprenoides e isoprenoides. Las composiciones y los métodos de la presente solicitud representan, por tanto, una mejora con respecto a lo que se ha puesto en práctica previamente en la técnica, tanto en el número de cepas de microorganismos disponibles para la producción aumentada de mevalonato, isopreno, moléculas precursoras de isoprenoides e isoprenoides así como en la cantidad de estos compuestos (por ejemplo, mevalonato) producidos por esas células (tales como células bacterianas).

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de la biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994). Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2.^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, N.Y. 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4.^a ed., John Wiley & Sons (Nueva York, N.Y. 1992), proporcionan al experto en la técnica una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

Definiciones

Los términos "ruta de mevalonato (MVA) completa" o "la ruta de mevalonato (MVA) en su totalidad" se refieren a la ruta metabólica celular que convierte acetil Co-A en pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y pirofosfato de isopentenilo (IPP) y que está catalizada por las enzimas acetoacetil-coenzima A sintasa (por ejemplo, tiolasa), 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa, mevalonato cinasa (MVK), fosfomevalonato cinasa (PMK), difosfomevalonato descarboxilasa (MVD) y difosfato de isopentenilo isomerasa (IDI).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "ruta de mevalonato superior" o "ruta de MVA superior" se refieren a la serie de reacciones en células catalizadas por las enzimas acetoacetil-coenzima A sintasa (por ejemplo, tiolasa), 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa y 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa.

Los términos "ruta de mevalonato inferior" o "ruta de MVA inferior" se refieren a la serie de reacciones en células catalizadas por las enzimas mevalonato cinasa (MVK), fosfomevalonato cinasa (PMK), difosfomevalonato descarboxilasa (MVD) y difosfato de isopentenilo isomerasa (IDI).

El término "isopreno" se refiere a 2-metil-1,3-butadieno (n.º CAS 78-79-5). Puede ser el producto hidrocarbonado C5 volátil final y directo de la eliminación de pirofosfato de difosfato de 3,3-dimetilalilo (DMAPP). Puede no implicar la unión o polimerización de moléculas de IPP para dar moléculas de DMAPP. El término "isopreno" no se pretende que esté limitado a su método de producción a menos que se indique de otro modo en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptidos" incluye polipéptidos, proteínas, péptidos, fragmentos de polipéptidos y polipéptidos de fusión.

Tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido aislado" no forma parte de una biblioteca de polipéptidos, tal como una biblioteca de 2, 5, 10, 20, 50 polipéptidos diferentes o más y se separa de al menos un componente con el que aparece en la naturaleza. Un polipéptido aislado puede obtenerse, por ejemplo, mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido.

Por "polipéptido heterólogo" quiere decirse un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico derivado

de un organismo, una especie o cepa diferente a la célula huésped. En algunas realizaciones, un polipéptido heterólogo no es idéntico a un polipéptido de tipo natural que se encuentra en la misma célula huésped en la naturaleza.

5 Tal como se usa en el presente documento, un “ácido nucleico” se refiere a dos o más desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos unidos de manera covalente conjuntamente en forma o bien mono o bien bicatenaria.

10 Por “ácido nucleico recombinante” quiere decirse un ácido nucleico de interés que está libre de uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, genes) que, en el genoma que se produce en la naturaleza del organismo del que deriva el ácido nucleico de interés, flanquean el ácido nucleico de interés. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de una procarionota o eucarionota, o que existe como molécula independiente (por ejemplo, un ADNc, un fragmento de ADN genómico o un fragmento de ADNc producido mediante PCR o digestión con endonucleasas de restricción) de manera independiente de otras secuencias.

15 Por “ácido nucleico heterólogo” quiere decirse una secuencia de ácido nucleico derivado de un organismo, una especie o cepa diferente a la célula huésped. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo no es idéntico a un ácido nucleico de tipo natural que se encuentra en la misma célula huésped en la naturaleza. Por ejemplo, un ácido nucleico codificado por los genes *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, los genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*) transformados en o integrados en el cromosoma de *E. coli* es un ácido nucleico heterólogo.

20 Tal como se usa en el presente documento, una “secuencia de control de la expresión” significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico de interés. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o uno inducible, o un potenciador. Una secuencia de control de la expresión puede ser “nativa” o heteróloga. Una secuencia de control de la expresión nativa deriva del mismo organismo, especie o cepa que el gen que se expresa. Una secuencia de control heteróloga de la expresión deriva de un organismo, una especie o cepa diferente que el gen que se expresa. Un “promotor inducible” es un promotor que es activo con regulación ambiental o de desarrollo.

30 Por “operativamente unido” quiere decirse una unión funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

35 Tal como se usa en el presente documento, los términos “medio mínimo” o “medios mínimos” se refieren a medio de crecimiento que contiene los mínimos nutrientes posibles para el crecimiento celular, generalmente sin la presencia de aminoácidos. El medio mínimo contiene normalmente: (1) una fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo (por ejemplo, bacteriano); (2) diversas sales, que pueden variar entre especies de microorganismo (por ejemplo, bacterianas) y condiciones de crecimiento; y (3) agua. La fuente de carbono puede variar significativamente, de azúcares simples como glucosa a hidrolizados más complejos de otra biomasa, tales como extracto de levadura, tal como se comenta en más detalle a continuación. Las sales proporcionan generalmente elementos esenciales tales como magnesio, nitrógeno, fósforo y azufre para permitir que las células sinteticen proteínas y ácidos nucleicos. El medio mínimo también puede complementarse con agentes selectivos, tales como antibióticos, para seleccionar el mantenimiento de determinados plásmidos y similares. Por ejemplo, si un microorganismo es resistente a un determinado antibiótico, tal como ampicilina o tetraciclina, entonces puede añadirse ese antibiótico al medio para impedir que crezcan células que carecen de la resistencia. El medio puede complementarse con otros compuestos según sea necesario para seleccionar características fisiológicas o bioquímicas deseadas, tales como aminoácidos particulares y similares.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “isoprenoide” se refiere a una clase grande y diversa de una clase que se produce de manera natural de compuestos orgánicos que se componen de dos o más unidades de hidrocarburos, consistiendo cada unidad en cinco átomos de carbono dispuestos en un patrón específico. Tal como se usa en el presente documento, “isopreno” está excluido expresamente de la definición de “isoprenoide”.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “terpenoide” se refiere a una clase grande y diversa de moléculas orgánicas derivadas de unidades de isoprenoide de cinco carbonos ensambladas y modificadas en una variedad de modos y clasificadas en grupos basándose en el número de unidades de isoprenoide usadas en miembros del grupo. Los hemiterpenoides tienen una unidad de isoprenoide. Los monoterpenoides tienen dos unidades de isoprenoide. Los sesquiterpenoides tienen tres unidades de isoprenoide. Los diterpenoides tienen cuatro unidades de isopreno. Los sesterterpenoides tienen cinco unidades de isoprenoide. Los triterpenoides tienen seis unidades de isoprenoide. Los tetraterpenoides tienen ocho unidades de isoprenoide. Los politerpenoides tienen más de ocho unidades de isoprenoide.

65 Tal como se usa en el presente documento, “precursor de isoprenoide” se refiere a cualquier molécula que se usa mediante organismos en la biosíntesis de terpenoides o isoprenoides. Los ejemplos no limitativos de moléculas precursoras de isoprenoides incluyen, por ejemplo, pirofosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo

(DMAPP).

Tal como se usa en el presente documento, el término “rendimiento en masa” se refiere a la masa del producto producido por las células (tales como células bacterianas) dividida entre la masa de la glucosa consumida por las células (tales como células bacterianas) multiplicado por 100.

Por “productividad específica”, quiere decirse la masa del producto producido por las células (tales como células bacterianas) dividida entre el producto del tiempo para la producción, la densidad celular y el volumen del cultivo.

Por “título”, quiere decirse la masa del producto producido por las células (tales como células bacterianas) dividida entre el volumen del cultivo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “índice de productividad celular (CPI)” se refiere a la masa del producto producido por las células (tales como células bacterianas) dividida entre la masa de las células (tales como células bacterianas) producidas en el cultivo.

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

Tal como se usa en el presente documento, los términos en singular “un(o)”, “una”, y “el/la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Se pretende que cada limitación numérica máxima facilitada en la totalidad de esta memoria descriptiva incluya cada limitación numérica inferior, como si tales limitaciones numéricas inferiores se redactaran expresamente en el presente documento. Cada limitación numérica mínima facilitada en la totalidad de esta memoria descriptiva incluirá cada limitación numérica superior, como si tales limitaciones numéricas superiores se redactaran expresamente en el presente documento. Cada intervalo numérico facilitado en la totalidad de esta memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más estrecho que se encuentre dentro de tal intervalo numérico más amplio, como si tales intervalos numéricos más estrechos se redactaran expresamente en el presente documento.

Células recombinantes (tales como células bacterianas) capaces de dar una producción aumentada de mevalonato

La ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato (ruta de MVA) es una ruta metabólica clave presente en todas las eucariotas superiores y determinadas bacterias. Además de ser importante para la producción de moléculas usadas en procesos tan diversos como la prenilación de proteínas, mantenimiento de membranas celulares, anclaje de proteínas y N-glicosilación, la ruta de mevalonato proporciona una fuente principal de las moléculas precursoras de isoprenoides DMAPP e IPP, que sirven como base para la biosíntesis de terpenos, terpenoides, isoprenoides e isopreno.

En la parte superior de la ruta de MVA, acetil Co-A producida durante el metabolismo celular se convierte en mevalonato mediante las acciones de polipéptidos que tienen actividad enzimática de tipo tiolasa, HMG-CoA reductasa y HMG-CoA sintasa. En primer lugar, se convierte acetil Co-A en acetoacetil CoA mediante la acción de una tiolasa. A continuación, se convierte acetoacetil CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) mediante la acción enzimática de HMG-CoA sintasa. Este derivado de Co-A se reduce a mevalonato por HMG-CoA reductasa, que es la etapa limitante de la velocidad de la ruta de mevalonato de producción de isoprenoides. Luego se convierte el mevalonato en mevalonato-5-fosfato mediante la acción de mevalonato cinasa que se transforma posteriormente en mevalonato-5-pirofosfato mediante la actividad enzimática de fosfomevalonato cinasa. Finalmente, se forma IPP a partir de mevalonato-5-pirofosfato mediante la actividad de la enzima mevalonato-5-pirofosfato descarboxilasa.

En algunos aspectos de la divulgación, la modulación de cualquiera de las enzimas a las que se hace referencia en el presente documento puede afectar a la expresión (por ejemplo, transcripción o traducción), producción, modificación postraduccional o cualquier otra función de la enzima. En algunas realizaciones, la función de la enzima (por ejemplo, capacidad catalítica) en células recombinantes está aumentada o disminuida en comparación con una célula que no se ha modificado por ingeniería genética para lograr tal modulación. En una realización, la función de la enzima (por ejemplo, actividad) está aumentada en comparación con una célula que no se ha modificado por ingeniería genética. En otra realización, la función de la enzima (por ejemplo, actividad) está disminuida en comparación con una célula que no se ha modificado por ingeniería genética.

Ruta de citrato sintasa

La citrato sintasa cataliza la condensación de oxaloacetato y acetil-CoA para formar citrato, un metabolito del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) (Ner, S. *et al.* 1983. *Biochemistry*, 22: 5243-5249; Bhayana, V. y Duckworth, H. 1984. *Biochemistry* 23: 2900-2905) (figura 5). En *E. coli*, esta enzima, codificada por *gltA*, se comporta como un trímero de subunidades diméricas. La forma hexamérica permite que la enzima se regule de manera alostérica por

NADH. Esta enzima se ha estudiado ampliamente (Wiegand, G., y Remington, S. 1986. Annual Rev. Biophysics Biophys. Chem.15: 97-117; Duckworth *et al.* 1987. Biochem Soc Symp. 54:83-92; Stockell, D. *et al.* 2003. J. Biol. Chem. 278: 35435-43; Maurus, R. *et al.* 2003. Biochemistry. 42:5555-5565). Para evitar la inhibición alostérica por NADH, se ha considerado el reemplazo por o complementación con la citrato sintasa insensible a NADH de *Bacillus subtilis* (Underwood *et al.* 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68:1071-1081; Sanchez *et al.* 2005. Met. Eng. 7:229-239).

La reacción catalizada por citrato sintasa compite directamente con la tiolasa que cataliza la primera etapa de la ruta de mevalonato, ya que ambas tienen acetil-CoA como sustrato (Hedl *et al.* 2002. J. Bact. 184:2116-2122). Por tanto, un experto en la técnica puede modular la expresión de citrato sintasa (por ejemplo, disminución de la actividad enzimática) para permitir que fluya más carbono a la ruta de mevalonato, aumentando de ese modo la eventual producción de mevalonato, isopreno e isoprenoides. La disminución de la actividad citrato sintasa puede ser cualquier cantidad de reducción de actividad específica o actividad total en comparación con cuando no se ha efectuado manipulación. En algunos casos, la disminución de la actividad enzimática está disminuida en al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %. En algunos aspectos, la actividad de citrato sintasa se modula disminuyendo la actividad de un gen de citrato sintasa endógeno. Esto puede conseguirse mediante reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH o usando un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH que deriva de *Bacillus subtilis*. La actividad de citrato sintasa también puede modularse (por ejemplo, disminuirse) reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. La disminución de la actividad de citrato sintasa puede dar como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa.

Rutas que implican fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa

La fosfotransacetilasa (*pta*) (Shimizu *et al.* 1969. Biochim. Biophys. Acta 191: 550-558) cataliza la conversión reversible entre acetil-CoA y fosfato de acetilo (acetil-P), mientras que la acetato cinasa (*ackA*) (Kakuda, H. *et al.* 1994. J. Biochem. 11:916-922) usa acetil-P para formar acetato. Estos genes pueden transcribirse como un operón en *E. coli*. Conjuntamente, catalizan la desasimilación de acetato, con la liberación de ATP. Por tanto, un experto en la técnica puede aumentar la cantidad de acetil Co-A disponible atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa (por ejemplo, el gen de fosfotransacetilasa endógeno) y/o un gen de acetato cinasa (por ejemplo, el gen de acetato cinasa endógeno). Un modo de lograr la atenuación es delecionando fosfotransacetilasa (*pta*) y/o acetato cinasa (*ackA*). Esto puede conseguirse reemplazando uno o ambos genes con un casete de cloranfenicol seguido por la retirada del casete. Se produce acetato por *E. coli* por una variedad de motivos (Wolfe, A. 2005. Microb. Mol. Biol. Rev. 69:12-50). Sin querer limitarse por la teoría, puesto que *ackA-pta* usan acetil-CoA, la delección de esos genes podría permitir que no se desvíe carbono para dar acetato y aumentar el rendimiento de mevalonato, isopreno o isoprenoides.

En algunos aspectos, el microorganismo recombinante produce cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno. La disminución de la cantidad de acetato producido puede medirse mediante ensayos de rutina que conoce un experto en la técnica. La cantidad de reducción de acetato es de al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % en comparación con cuando no se realizan manipulaciones moleculares.

La actividad de fosfotransacetilasa (*pta*) y/o acetato cinasa (*ackA*) también puede disminuirse mediante otra manipulación molecular de las enzimas. La disminución de la actividad enzimática puede ser cualquier cantidad de reducción de actividad específica o actividad total en comparación con cuando no se ha efectuado manipulación. En algunos casos, la disminución de la actividad enzimática está disminuida en al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %.

En algunos casos, la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno.

Rutas que implican lactato deshidrogenasa

En *E. coli*, se produce D-lactato a partir de piruvato a través de la enzima lactato deshidrogenasa (*ldhA* - figura 5) (Bunch, P. *et al.* 1997. Microbiol. 143:187-195). La producción de lactato está acompañada de oxidación de NADH, así, se produce lactato cuando el oxígeno es limitado y no puede ajustarse a todos los equivalentes reductores. Por

tanto, la producción de lactato podría ser una fuente para el consumo de carbono. Como tal, para mejorar el flujo directo de carbono a la producción de mevalonato (y producción de isopreno, precursores de isoprenoides e isoprenoides, si se desea), un experto en la técnica puede modular la actividad de lactato deshidrogenasa, tal como disminuyendo la actividad de la enzima.

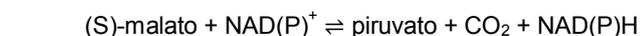
5 Por consiguiente, en un aspecto, la actividad de lactato deshidrogenasa puede modularse atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno. Puede lograrse tal atenuación mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. También pueden usarse otros modos de atenuar la actividad del gen de lactato deshidrogenasa que conoce un experto en la técnica. Manipulando la ruta que implica lactato deshidrogenasa, el
10 microorganismo recombinante produce cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno. La disminución de la cantidad de lactato producido puede medirse mediante ensayos de rutina que conoce un experto en la técnica. La cantidad de reducción de lactato es de al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % en comparación con cuando
15 no se realizan manipulaciones moleculares.

La actividad de lactato deshidrogenasa también puede disminuirse mediante otras manipulaciones moleculares de la enzima. La disminución de la actividad enzimática puede ser cualquier cantidad de reducción de actividad específica o actividad total en comparación con cuando no se ha efectuado manipulación. En algunos casos, la disminución de la actividad enzimática está disminuida en al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %.

25 Por consiguiente, en algunos casos, la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno.

Rutas que implican la enzima málica

30 La enzima málica (en *E. coli*, *sfcA* y *maeB*) es una enzima anaplerótica que cataliza la conversión de malato en piruvato (usando NAD⁺ o NADP⁺) mediante la ecuación a continuación:



Por tanto, los dos sustratos de esta enzima son (S)-malato y NAD(P)⁺, mientras que sus 3 productos son piruvato, CO₂ y NADPH.

40 La expresión de la enzima málica dependiente de NADP (*maeB* - figura 5) (Iwikura, M. *et al.* 1979. J. Biochem. 85: 1355-1365) puede ayudar a aumentar el rendimiento de mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides e isoprenoides 1) devolviendo el carbono del ciclo de TCA de vuelta a piruvato, precursor directo de acetil-CoA, precursor directo a su vez de la ruta de mevalonato y 2) produciendo NADPH extra que podría usarse en la reacción de HMG-CoA reductasa (Oh, MK *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 13175-13183; Bologna, F. *et al.* (2007) J. Bact. 189:5937-5946).

45 Como tal, puede lograrse más sustrato de partida (piruvato o acetil-CoA) para la producción posterior de mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides e isoprenoides modulando, tal como aumentando, la actividad y/o expresión de enzima málica. El gen de enzima málica dependiente de NADP puede ser un gen endógeno. Un modo no limitativo para conseguir esto es reemplazar el promotor de gen de enzima málica dependiente de NADP
50 endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético. Otro modo no limitativo para aumentar la actividad enzimática es usar uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de enzima málica dependiente de NADP. Un experto en la técnica puede monitorizar la expresión de ARN de *maeB* durante la fermentación o el cultivo usando técnicas de la biología molecular fácilmente disponibles.

55 Por consiguiente, en algunas realizaciones, el microorganismo recombinante produce cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de enzima málica dependiente de NADP. En algunos aspectos, el aumento de la actividad de un gen de enzima málica dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de gen de enzima málica dependiente de NADP.

60 El aumento de la cantidad de piruvato producido puede medirse mediante ensayos de rutina que conoce un experto en la técnica. La cantidad de aumento de piruvato puede ser de al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % en comparación con cuando no se realizan manipulaciones moleculares.
65

La actividad de enzima málica también puede aumentarse mediante otras manipulaciones moleculares de la enzima. El aumento de la actividad enzimática puede ser cualquier cantidad de aumento de actividad específica o actividad total en comparación con cuando no se ha efectuado manipulación. En algunos casos, el aumento de la actividad enzimática es de al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %.

Rutas que implican complejo de piruvato deshidrogenasa

El complejo de piruvato deshidrogenasa, que cataliza la descarboxilación de piruvato en acetil-CoA, se compone de las proteínas codificadas por los genes *aceE*, *aceF* e *lpdA*. La transcripción de esos genes está regulada por varios reguladores. Por tanto, un experto en la técnica puede aumentar acetil-CoA modulando la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa. La modulación puede ser para aumentar la actividad y/o expresión (por ejemplo, expresión constante) del complejo de piruvato deshidrogenasa. Esto puede conseguirse mediante diferentes modos, por ejemplo, colocando un fuerte promotor constitutivo, como PL.6 (aattcatataaaaaacatacagataaccatctgcggtgataaattatctctggcggtgttgacataaataaccactggcggtgatactgagcac atcagcaggacgcactgaccacatgaaggtg - promotor lambda, GenBank NC_001416), delante del operón o usando uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos.

Por consiguiente, en un aspecto, la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa. Se entiende que uno cualquiera, dos o tres de estos genes pueden manipularse para aumentar la actividad de piruvato deshidrogenasa. En otro aspecto, la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa puede modularse atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno, detallado adicionalmente a continuación. La actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno puede atenuarse mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno.

En algunos casos, uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos. Otro modo para aumentar la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa es introduciendo en el microorganismo uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa.

Usando cualquiera de estos métodos, el microorganismo recombinante puede producir cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula. La modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa puede dar como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada.

Combinaciones de mutaciones

Se entiende que para cualquiera de las enzimas y/o rutas enzimáticas descritas en el presente documento, se contemplan expresamente manipulaciones moleculares que modulan cualquier combinación (dos, tres, cuatro, cinco o seis) de las enzimas y/o rutas enzimáticas descritas en el presente documento. Para facilidad de mención de las combinaciones, citrato sintasa (*gltA*) se designa como A, fosfotransacetilasa (*ptaB*) se designa como B, acetato cinasa (*ackA*) se designa como C, lactato deshidrogenasa (*ldhA*) se designa como D, enzima málica (*sfcA* o *maeB*) se designa como E, piruvato descarboxilasa (*aceE*, *aceF* y/o *lpdA*) se designa como F, 6-fosfogluconolactonasa (*ybhE*) se designa como G y fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppf*) se designa como H. Tal como se comentó anteriormente, las enzimas *aceE*, *aceF* y/o *lpdA* del complejo de piruvato descarboxilasa pueden usarse individualmente, o dos de tres enzimas, o tres de tres enzimas para aumentar la actividad piruvato descarboxilasa.

Por consiguiente, para combinaciones de cualquier dos de las enzimas A-H, combinaciones no limitativas que pueden usarse son: AB, AC, AD, AE, AF, AG, AH, BC, BD, BE, BF, BG, BH, CD, CE, CF, CG, CH, DE, DF, DG, DH, EF, EG, EH y GH. Para combinaciones de cualquier tres de las enzimas A-H, combinaciones no limitativas que pueden usarse son: ABC, ABD, ABE, ABF, ABG, ABH, BCD, BCE, BCF, BCG, BCH, CDE, CDF, CDG, CDH, DEF, DEH, ACD, ACE, ACF, ACG, ACH, ADE, ADF, ADG, ADH, AEF, AEG, AEH, BDE, BDF, BDG, BDH, BEF, BEG, BEH, CEF, CEG, CEH, CFG, CFH y CGH. Para combinaciones de cualquier cuatro de las enzimas A-H, combinaciones no limitativas que pueden usarse son: ABCD, ABCE, ABCF, ABCG, ABCH, ABDE, ABDF, ABDG, ABDH, ABEF, ABEG, ABEH, BCDE, BCDF, BCDG, BCDH, CDEF, CDEG, CDEH, ACDE, ACDF, ACDG, ACDH, ACEF, ACEG, ACEH, BCEF, BDEF, BGEF, BHEF, ADEF. Para combinaciones de cualquier cinco de las enzimas A-H, combinaciones no limitativas que pueden usarse son: ABCDE, ABCDF, ABCDG, ABCDH, ABDEF, ABDEG, ABDEH, BCDEF, BCDEG, BCDEH, ACDEF, ACDEG, ACEDH, ABCEF, ABCEG y ABCEH. Para combinaciones de cualquier seis de las enzimas A-H, combinaciones no limitativas que pueden usarse son: ABCDEF, ABCDEG, ABCDEH, BCDEFG, BCDEFH y CDEFGH. Para combinaciones de cualquier siete de las enzimas A-H, combinaciones no limitativas que pueden usarse son: ABCDEFG, ABCDEFH, BCDEFGH. En otro aspecto, se usan combinaciones con las ocho enzimas ABCDEFGH.

el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, una mayor productividad volumétrica de isopreno en comparación con microorganismos que expresan fosfoenolpiruvato carboxilasa a niveles de tipo natural. En otros aspectos, la expresión disminuida de fosfoenolpiruvato carboxilasa da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, una mayor productividad específica pico de isopreno en comparación con microorganismos que expresan fosfoenolpiruvato carboxilasa a niveles de tipo natural. En algunos aspectos la expresión disminuida de fosfoenolpiruvato carboxilasa da como resultado una productividad específica pico que se mantiene durante un periodo de tiempo más largo en comparación con microorganismos que expresan fosfoenolpiruvato carboxilasa a niveles de tipo natural.

En otro aspecto, la modulación del inhibidor de la actividad de RssB durante la expresión génica con privación de magnesio (*iraM* en *E. coli*) puede usarse para mejorar la producción de mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides e isoprenoides en cualquiera de las células divulgadas en el presente documento. En un aspecto, la expresión génica de *iraM* puede aumentarse reemplazando la secuencia promotora del gen *iraM* por otro promotor que da como resultado la expresión aumentada del gen *iraM* en comparación con células de tipo natural. En algunos aspectos, la expresión del gen *iraM* puede aumentarse en cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, en comparación con células de tipo natural. En algunos aspectos, la expresión aumentada del gen *iraM* da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, tal como cualquier valor intermedio en estos porcentajes, un mayor porcentaje de rendimiento de isopreno en comparación con microorganismos que expresan el gen *iraM* a niveles de tipo natural. En otros aspectos, la expresión aumentada del gen *iraM* da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, un mayor porcentaje instantáneo de rendimiento de isopreno en comparación con microorganismos que expresan el gen *iraM* a niveles de tipo natural. En otros aspectos, la expresión aumentada del gen *iraM* da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, un mayor índice de productividad celular para isopreno en comparación con microorganismos que expresan el gen *iraM* a niveles de tipo natural. En otros aspectos, la expresión aumentada del gen *iraM* da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, una mayor productividad volumétrica de isopreno en comparación con microorganismos que expresan el gen *iraM* a niveles de tipo natural. En otros aspectos, la expresión aumentada del gen *iraM* da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, una mayor productividad específica pico de isopreno en comparación con microorganismos que expresan el gen *iraM* a niveles de tipo natural. En algunos aspectos la expresión aumentada del gen *iraM* da como resultado una productividad específica pico que se mantiene durante un periodo de tiempo más largo en comparación con microorganismos que expresan el gen *iraM* a niveles de tipo natural.

En otro aspecto, la modulación de la expresión génica del componente *acrA* de la bomba de flujo de múltiples fármacos *acrAB-TolC* (*acrA* en *E. coli*) puede usarse para mejorar la producción de mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides e isoprenoides en cualquiera de las células divulgadas en el presente documento. En un aspecto, la expresión génica de *acrA* puede disminuirse reemplazando la secuencia promotora del gen *acrA* por otro promotor que da como resultado la expresión disminuida del gen *acrA* en comparación con células de tipo natural. En algunos aspectos, la expresión génica del gen *acrA* puede disminuirse en cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, en comparación con células de tipo natural. En otro aspecto, la expresión de *acrA* puede abolirse por completo, tal como deleccionando, el gen *acrA* en el genoma de la célula, de modo que ya no produce una proteína *acrA* funcional. En algunos aspectos, la deleción o la expresión disminuida del gen *acrA* da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, tal como cualquier valor intermedio en estos porcentajes, un mayor porcentaje de rendimiento de isopreno en comparación con microorganismos que expresan el gen *acrA* a niveles de tipo natural. En otros aspectos, la deleción o la expresión disminuida del gen *acrA* da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, un mayor índice de productividad celular para isopreno en comparación con microorganismos que expresan el gen *acrA* a niveles de tipo natural. En otros aspectos, la deleción o la expresión disminuida del gen *acrA* da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, una mayor productividad volumétrica de isopreno en comparación con microorganismos que expresan el gen *acrA* a niveles de tipo natural. En otros aspectos, la deleción o la

expresión disminuida del gen *acrA* da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, una mayor productividad específica pico de isopreno en comparación con microorganismos que expresan el gen *acrA* a niveles de tipo natural. En algunos aspectos deleción o la expresión disminuida del gen *acrA* da como resultado una productividad específica pico que se mantiene durante un periodo de tiempo más largo en comparación con microorganismos que expresan el gen *acrA* a niveles de tipo natural.

En otro aspecto, la modulación de la expresión génica del regulador transcripcional de unión a ADN de FNR (FNR) puede usarse para mejorar la producción de mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides e isoprenoides en cualquiera de las células divulgadas en el presente documento. En un aspecto, la expresión génica de FNR puede aumentarse reemplazando la secuencia promotora del gen que codifica FNR por otro promotor que da como resultado una expresión aumentada de FNR en comparación con células de tipo natural. En otros aspectos, un ácido nucleico heterólogo que codifica FNR puede expresarse en una célula que no expresa de manera endógena FNR. En algunos aspectos, la expresión de FNR puede aumentarse en cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, en comparación con células de tipo natural o células que no expresan de manera endógena FNR. En algunos aspectos, la expresión aumentada de FNR da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, tal como cualquier valor intermedio en estos porcentajes, un mayor porcentaje de rendimiento de isopreno en comparación con células de tipo natural o células que no expresan de manera endógena FNR. En otros aspectos, la expresión aumentada de FNR da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, un mayor porcentaje instantáneo de rendimiento de isopreno en comparación con en comparación con células de tipo natural o células que no expresan de manera endógena FNR. En otros aspectos, la expresión aumentada de FNR da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, un mayor índice de productividad celular para isopreno en comparación con células de tipo natural o células que no expresan de manera endógena FNR. En otros aspectos, la expresión aumentada de FNR da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, una mayor productividad volumétrica de isopreno en comparación con células de tipo natural o células que no expresan de manera endógena FNR. En otros aspectos, la expresión aumentada de FNR da como resultado cualquiera de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %, inclusive, incluyendo cualquier valor intermedio en estos porcentajes, una mayor productividad específica pico de isopreno en comparación con células de tipo natural o células que no expresan de manera endógena FNR. En algunos aspectos la expresión aumentada de FNR da como resultado una productividad específica pico que se mantiene durante un periodo de tiempo más largo i en comparación con células de tipo natural o células que no expresan de manera endógena FNR.

Además de las mutaciones en la célula huésped (por ejemplo, microorganismo) para modular diversas rutas enzimáticas descritas en el presente documento que aumentan el flujo de carbono hacia la producción de mevalonato, pueden usarse células huésped que expresan una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica polipéptidos de la ruta de MVA superior junto con las mutaciones en la célula huésped para aumentar la producción de productos finales deseados, tales como mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides e isoprenoides. En otra realización, genes que codifican *mvaE* y *mvaS* de diversas especies pueden usarse junto con las mutaciones en la célula huésped para aumentar la producción de productos finales deseados, tales como mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides e isoprenoides.

Además, otras enzimas de la ruta de MVA superior e inferior pueden usarse así como los productos de los genes *mvaE* y *mvaS*. Los ejemplos no limitativos de polipéptidos de la ruta de MVA incluyen polipéptidos de acetil-CoA acetiltransferasa (AA-CoA tiolasa), polipéptidos de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMG-CoA sintasa), polipéptidos de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), polipéptidos de mevalonato cinasa (MVK), polipéptidos de fosfomevalonato cinasa (PMK), polipéptidos de difosfomevalonato descarboxilasa (MVD), polipéptidos de fosfomevalonato descarboxilasa (PMDC), polipéptidos de fosfato de isopentenilo cinasa (IPK), polipéptidos de IDI y polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos de fusión) que tienen una actividad de dos o más polipéptidos de la ruta de MVA. Los polipéptidos de la ruta de MVA pueden incluir polipéptidos, fragmentos de polipéptidos, péptidos y polipéptidos de fusión que tienen al menos una actividad de un polipéptido de la ruta de MVA. Los ácidos nucleicos de la ruta de MVA a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un polipéptido de la ruta de MVA. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de la ruta de MVA a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento.

Se describen ejemplos no limitativos de polipéptidos de la ruta de MVA que pueden usarse en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.^{os} WO2009/076676; WO2010/003007 y WO2010/148150.

Genes que codifican polipéptidos de *mvaE* y *mvaS*

En algunos microorganismos (tales como pero sin limitarse a, *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. faecalis*), el gen *mvaE* codifica un polipéptido que presenta actividades tanto de tiolasa como de HMG-CoA reductasa. De hecho, el producto del gen *mvaE* representó la primera enzima bifuncional de la biosíntesis de IPP hallada en eubacterias y el primer ejemplo de HMG-CoA reductasa fusionada a otra proteína en la naturaleza (Hedl, *et al.*, J Bacteriol. Abril de 2002; 184(8): 2116-2122). Por otro lado, el gen *mvaS* codifica un polipéptido que tiene una actividad HMG-CoA sintasa. Los genes *mvaE* y *mvaS* de una especie bacteriana diferente, *E. faecalis*, se han incorporado en las cepas de *E. coli* previamente para producir mevalonato (véase el documento US 2005/0287655 A1; Tabata, K. y Hashimoto, S.-I. Biotechnology Letters 26: 1487-1491, 2004).

Por consiguiente, pueden modificarse por ingeniería genética células (tales como células bacterianas, por ejemplo, *E. coli*) para expresar uno o más genes *mvaE* y *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), para aumentar la producción, el título pico y la productividad celular de mevalonato. El uno o más genes *mvaE* y *mvaS* pueden expresarse en un plásmido multicopia. El plásmido puede ser un plásmido de alto número de copias, un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de número medio de copias. Alternativamente, el uno o más genes *mvaE* y *mvaS* pueden integrarse en el cromosoma de la célula huésped. Tanto para la expresión heteróloga del uno o más genes *mvaE* y *mvaS* en un plásmido o como parte integrada del cromosoma de la célula huésped, la expresión de los genes puede estar dirigida o bien por un promotor inducible o bien por un promotor que se expresa de manera constitutiva. El promotor puede ser un controlador fuerte de la expresión, puede ser un controlador débil de la expresión, o puede ser un controlador medio de la expresión del uno o más genes *mvaE* y *mvaS*.

Tabla 1: Opciones para la expresión de genes *mvaE* y *mvaS* en células huésped contempladas para la presente invención.

	<i>L. grayi</i> , <i>mvaE</i>	<i>E. faecium</i> , <i>mvaE</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>mvaE</i>	<i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaE</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>mvaE</i>
<i>L. grayi</i> , <i>mvaS</i>	<i>L. grayi</i> , <i>mvaE</i> <i>L. grayi</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecium</i> , <i>mvaE</i> <i>L. grayi</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>mvaE</i> <i>L. grayi</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaE</i> <i>L. grayi</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>mvaE</i> <i>L. grayi</i> , <i>mvaS</i>
<i>E. faecium</i> , <i>mvaS</i>	<i>L. grayi</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecium</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecium</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecium</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecium</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecium</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecium</i> , <i>mvaS</i>
<i>E. gallinarum</i> , <i>mvaS</i>	<i>L. grayi</i> , <i>mvaE</i> <i>E. gallinarum</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecium</i> , <i>mvaE</i> <i>E. gallinarum</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>mvaE</i> <i>E. gallinarum</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaE</i> <i>E. gallinarum</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>mvaE</i> <i>E. gallinarum</i> , <i>mvaS</i>
<i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaS</i>	<i>L. grayi</i> , <i>mvaE</i> <i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecium</i> , <i>mvaE</i> <i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>mvaE</i> <i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaE</i> <i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>mvaE</i> <i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaS</i>
<i>E. faecalis</i> , <i>mvaS</i>	<i>L. grayi</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecalis</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecium</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecalis</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecalis</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. casseliflavus</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecalis</i> , <i>mvaS</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>mvaE</i> <i>E. faecalis</i> , <i>mvaS</i>

Polipéptidos y ácidos nucleicos de *mvaE* a modo de ejemplo

El gen *mvaE* codifica un polipéptido que presenta actividades tanto de tiolasa como de HMG-CoA reductasa. La actividad tiolasa del polipéptido codificado por el gen *mvaE* convierte acetil Co-A en acetoacetil CoA mientras que la actividad enzimática HMG-CoA reductasa del polipéptido convierte 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en mevalonato. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de *mvaE* a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento así como polipéptidos y ácidos nucleicos mutantes derivados de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento que tienen al menos una actividad de un polipéptido de *mvaE*.

Los polipéptidos de *mvaE* mutantes incluyen aquellos en los que uno o más residuos de aminoácido han experimentado una sustitución de aminoácido mientras que conservan la actividad del polipéptido de *mvaE* (es decir, la capacidad para convertir acetil Co-A en acetoacetil CoA así como la capacidad para convertir 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en mevalonato). Las sustituciones de aminoácido pueden ser conservativas o no conservativas y tales residuos de aminoácido sustituidos pueden ser o no uno codificado por el código genético. El "alfabeto"

convencional de veinte aminoácidos se ha dividido en familias químicas basándose en la similitud de sus cadenas laterales. Esas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral químicamente similar (es decir, reemplazo de un aminoácido que tiene una cadena lateral básica por otro aminoácido que tiene una cadena lateral básica). Una "sustitución de aminoácido no conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral químicamente diferente (es decir, reemplazo de un aminoácido que tiene una cadena lateral básica por otro aminoácido que tiene una cadena lateral aromática).

Las sustituciones de aminoácido en el polipéptido de *mvaE* pueden introducirse para mejorar la funcionalidad de la molécula. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido que aumentan la afinidad de unión del polipéptido de *mvaE* por su sustrato, o que mejoran su capacidad para convertir acetil Co-A en acetoacetil CoA y/o la capacidad para convertir 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en mevalonato pueden introducirse en el polipéptido de *mvaE*. En algunos aspectos, los polipéptidos de *mvaE* mutantes contienen una o más sustituciones de aminoácido conservativas.

En un aspecto, las proteínas *mvaE* que no se degradan o son menos propensas a degradación pueden usarse para la producción de mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides y/o isoprenoides. Los ejemplos de productos génicos de *mvaE* que no se degradan o son menos propensos a degradación que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, los de los organismos *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis* y *L. grayi*. Un experto en la técnica puede expresar proteína *mvaE* en *E. coli* BL21 (DE3) y examinar la ausencia de fragmentos mediante cualquier técnica convencional de la biología molecular. Por ejemplo, puede identificarse la ausencia de fragmentos en geles de SDS-PAGE teñidos con Safestain tras purificación mediada por cola de His o cuando se expresan en *E. coli* BL21 que produce mevalonato, isopreno o isoprenoides usando los métodos de detección descritos en el presente documento. Pueden usarse métodos convencionales, tales como los descritos en Hedl *et al.*, (J Bacteriol. Abril de 2002; 184(8): 2116-2122) para determinar si un polipéptido tiene actividad *mvaE*, midiendo la actividad acetoacetil-CoA tiolasa así como HMG-CoA reductasa. En un ensayo a modo de ejemplo, se mide la actividad acetoacetil-CoA tiolasa mediante un espectrofotómetro para monitorizar el cambio en absorbancia a 302 nm que acompaña a la formación o tiólisis de acetoacetil-CoA. Condiciones de ensayo convencionales para cada reacción para determinar la síntesis de acetoacetil-CoA, son acetil-CoA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, Tris 50 mM, pH 10,5 y se inicia la reacción mediante la adición de enzima. Los ensayos pueden emplear un volumen final de 200 µl. Para el ensayo, 1 unidad enzimática (UE) representa la síntesis o tiólisis en 1 min de 1 µmol de acetoacetil-CoA. En otro ensayo a modo de ejemplo, puede monitorizarse la actividad de HMG-CoA reductasa mediante un espectrofotómetro mediante la aparición o desaparición de NADP(H) a 340 nm. Condiciones de ensayo convencionales para cada reacción que se mide que muestran desacilación reductora de HMG-CoA en mevalonato son NADPH 0,4 mM, (R,S)-HMG-CoA 1,0 mM, KCl 100 mM y K_xPO₄ 100 mM, pH 6,5. Los ensayos emplean un volumen final de 200 µl. Se inician las reacciones añadiendo la enzima. Para el ensayo, 1 UE representa el recambio, en 1 min, de 1 µmol de NADP(H). Esto corresponde al recambio de 0,5 µmol de HMG-CoA o mevalonato.

Alternativamente, la producción de mevalonato en células (tales como células bacterianas) puede medirse mediante, sin limitación, cromatografía de gases (véase la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º: US 2005/0287655 A1) o HPLC (véase la solicitud de patente estadounidense n.º: 12/978.324). Como ensayo a modo de ejemplo, pueden inocularse cultivos en tubos de agitación que contienen caldo LB complementado con uno o más antibióticos e incubarse durante 14 h a 34 °C a 250 rpm. A continuación, pueden diluirse los cultivos en placas de pocillos que contienen medios TM3 complementados con glucosa al 1 %, extracto de levadura al 0,1 % e IPTG 200 µM hasta una DO final de 0,2. Entonces se sella la placa con una membrana Breath Easier (Diversified Biotech) y se incuba a 34 °C en un agitador/incubador a 600 rpm durante 24 horas. Entonces se centrifuga 1 ml de cada cultivo a 3000 × g durante 5 min. Entonces se añade el sobrenadante a ácido sulfúrico al 20 % y se incuba en hielo durante 5 min. Entonces se centrifuga la mezcla durante 5 min a 3000 × g y se recoge el sobrenadante para análisis mediante HPLC. Se determina la concentración de mevalonato en las muestras mediante comparación con una curva patrón de mevalonato (Sigma). La concentración de glucosa puede medirse adicionalmente realizando un ensayo de glucosa oxidasa según cualquier método conocido en la técnica. Usando HPLC, pueden cuantificarse los niveles de mevalonato comparando la respuesta de índice de refracción de cada muestra frente a una curva de calibración generada haciendo correr diversas disoluciones que contienen mevalonato de concentración conocida.

Los ácidos nucleicos de *mvaE* a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un polipéptido de *mvaE*. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de *mvaE* a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento así como polipéptidos y ácidos nucleicos mutantes derivados de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento. Los ácidos nucleicos de *mvaE* a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos de *mvaE* aislados de *Listeria grayi* DSM 20601, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* EG2 y/o *Enterococcus*

5 *casseliflavus*. El ácido nucleico codificado por el gen *mvaE* de *Listeria grayi* DSM 20601 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 %, el 85 % con SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, el ácido nucleico codificado por el gen *mvaE* de *Listeria grayi* DSM 20601 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:1. El ácido nucleico codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus faecium* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:3. En otro aspecto, el ácido nucleico codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus faecium* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:3. El ácido nucleico codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus gallinarum* EG2 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:5. En otro aspecto, el ácido nucleico codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus gallinarum* EG2 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:5. El ácido nucleico codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus casseliflavus* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:7. En otro aspecto, el ácido nucleico codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus casseliflavus* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:7. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, los polipéptidos de la ruta de MVA superior pueden estar codificados por un ácido nucleico con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 %, el 85 %, el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-8. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, los polipéptidos de la ruta de MVA superior pueden estar codificados por un ácido nucleico con una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-8.

Los polipéptidos de *mvaE* a modo de ejemplo incluyen fragmentos de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tienen al menos una actividad de un polipéptido de *mvaE*. Los polipéptidos de *mvaE* a modo de ejemplo e incluyen polipéptidos que se producen de manera natural de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento así como polipéptidos mutantes derivados de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento. Los polipéptidos de *mvaE* a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* aislados de *Listeria grayi* DSM 20601, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* EG2 y/o *Enterococcus casseliflavus*. El polipéptido de *mvaE* codificado por el gen *mvaE* de *Listeria grayi* DSM 20601 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 %, el 85 % con SEQ ID NO: 13. En otro aspecto, el polipéptido de *mvaE* codificado por el gen *mvaE* de *Listeria grayi* DSM 20601 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO: 13. El polipéptido de *mvaE* codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus faecium* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:15. En otro aspecto, el polipéptido de *mvaE* codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus faecium* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:15. El polipéptido de *mvaE* codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus gallinarum* EG2 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:11. En otro aspecto, el polipéptido de *mvaE* codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus gallinarum* EG2 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:11. El polipéptido de *mvaE* codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus casseliflavus* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:17. En otro aspecto, el polipéptido de *mvaE* codificado por el gen *mvaE* de *Enterococcus casseliflavus* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:17. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, los polipéptidos de la ruta de MVA superior pueden estar codificados por un polipéptido con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 %, el 85 %, el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con una cualquiera de las SEQ ID NO:11-18. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, los polipéptidos de la ruta de MVA superior pueden estar codificados por un polipéptido con una cualquiera de las SEQ ID NO:11-18.

El ácido nucleico de *mvaE* puede expresarse en una célula (tal como una célula bacteriana) en un plásmido multicopia. El plásmido puede ser un plásmido de alto número de copias, un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de número medio de copias. Alternativamente, el ácido nucleico de *mvaE* puede integrarse en el cromosoma de la célula huésped. Tanto para la expresión heteróloga de un ácido nucleico de *mvaE* en un plásmido o como parte integrada del cromosoma de la célula huésped, la expresión del ácido nucleico puede estar dirigida o bien por un promotor inducible o bien por un promotor que se expresa de manera constitutiva. El promotor puede ser un controlador fuerte de la expresión, puede ser un controlador débil de la expresión, o puede ser un controlador medio de la expresión del ácido nucleico de *mvaE*.

Polipéptidos y ácidos nucleicos de *mvaS* a modo de ejemplo

El gen *mvaS* codifica un polipéptido que presenta actividad HMG-CoA sintasa. Este polipéptido puede convertir acetoacetil CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Los polipéptidos y ácidos nucleicos de *mvaS* a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento así como polipéptidos y ácidos nucleicos mutantes derivados de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento que tienen al menos una actividad de un polipéptido de *mvaS*.

Los polipéptidos de *mvaS* mutantes incluyen aquellos en los que uno o más residuos de aminoácido han experimentado una sustitución de aminoácido mientras que conservan la actividad del polipéptido de *mvaS* (es decir, la capacidad para convertir acetoacetil CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA). Las sustituciones de aminoácido en el polipéptido de *mvaS* pueden introducirse para mejorar la funcionalidad de la molécula. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido que aumentan la afinidad de unión del polipéptido de *mvaS* por su sustrato, o que mejoran su capacidad para convertir acetoacetil CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA pueden introducirse en el polipéptido de *mvaS*. En algunos aspectos, los polipéptidos de *mvaS* mutantes contienen una o más sustituciones de aminoácido conservativas.

Pueden usarse métodos convencionales, tales como los descritos en Quant *et al.* (Biochem J., 1989, 262:159-164), para determinar si un polipéptido tiene actividad *mvaS*, midiendo la actividad HMG-CoA sintasa. En un ensayo a modo de ejemplo, puede someterse a ensayo la actividad HMG-CoA sintasa midiendo de manera espectrofotométrica la desaparición de la forma enólica de acetoacetil-CoA monitorizando el cambio de absorbancia a 303 nm. Un sistema de ensayo de 1 ml convencional que contiene Tris/HCl 5 mM, pH 8,0, MgCl₂ 10 mM y ditiotreitól 0,2 mM a 30 °C; fosfato de acetilo 5 mM, acetoacetil-CoA 10 M y 5 muestras u1 de extractos pueden añadirse, seguido por la adición simultánea de acetil-CoA (100 uM) y 10 unidades de PTA. Entonces se mide la actividad HMG-CoA sintasa como la diferencia en la velocidad antes y después de la adición de acetil-CoA. El coeficiente de absorción de acetoacetil-CoA en las condiciones usadas (pH 8,0, MgCl₂ 10 mM), es de $12,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por definición, 1 unidad de actividad enzimática provoca que se transforme 1 umol de acetoacetil-CoA por minuto.

Alternativamente, la producción de mevalonato en células (tales como células bacterianas) puede medirse mediante, sin limitación, cromatografía de gases (véase la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º: US 2005/0287655 A1) o HPLC (véase la solicitud de patente estadounidense n.º: 12/978.324). Como ensayo a modo de ejemplo, pueden inocularse cultivos en tubos de agitación que contienen caldo LB complementado con uno o más antibióticos e incubarse durante 14 h a 34 °C a 250 rpm. A continuación, pueden diluirse los cultivos en placas de pocillos que contienen medios TM3 complementados con glucosa al 1 %, extracto de levadura al 0,1 % e IPTG 200 uM hasta una DO final de 0,2. Entonces se sella la placa con una membrana Breath Easier (Diversified Biotech) y se incuba a 34 °C en un agitador/incubador a 600 rpm durante 24 horas. Entonces se centrifuga 1 ml de cada cultivo a 3000 × g durante 5 min. Entonces se añade el sobrenadante a ácido sulfúrico al 20 % y se incuba en hielo durante 5 min. Entonces se centrifuga la mezcla durante 5 min a 3.000 × g y se recoge el sobrenadante para análisis mediante HPLC. Se determina la concentración de mevalonato en las muestras mediante comparación con una curva patrón de mevalonato (Sigma). La concentración de glucosa puede medirse adicionalmente realizando un ensayo de glucosa oxidasa según cualquier método conocido en la técnica. Usando HPLC, pueden cuantificarse los niveles de mevalonato comparando la respuesta de índice de refracción de cada muestra frente a una curva de calibración generada haciendo correr diversas disoluciones que contienen mevalonato de concentración conocida.

Los ácidos nucleicos de *mvaS* a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un polipéptido de *mvaS*. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de *mvaS* a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento así como polipéptidos y ácidos nucleicos mutantes derivados de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento. Los ácidos nucleicos de *mvaS* a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos de *mvaS* aislados de *Listeria grayi*_DSM 20601, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* EG2 y/o *Enterococcus casseliflavus*. El ácido nucleico de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Listeria grayi*_DSM 20601 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:2. El ácido nucleico de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Listeria grayi*_DSM 20601 también puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:2. El ácido nucleico de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus faecium* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:4. El ácido nucleico de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus faecium* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:4. El ácido nucleico de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus gallinarum* EG2 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID

NO:6. El ácido nucleico de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus gallinarum* EG2 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:6. El ácido nucleico de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus casseliflavus* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:8. El ácido nucleico de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus casseliflavus* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:8.

Los polipéptidos de *mvaS* a modo de ejemplo incluyen fragmentos de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un polipéptido de *mvaS*. Los polipéptidos de *mvaS* a modo de ejemplo incluyen polipéptidos que se producen de manera natural y polipéptidos de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento así como polipéptidos mutantes derivados de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento. Los polipéptidos de *mvaS* a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, polipéptidos de *mvaS* aislados de *Listeria grayi*_DSM 20601, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* EG2 y/o *Enterococcus casseliflavus*. El polipéptido de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Listeria grayi*_DSM 20601 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:14. El polipéptido de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Listeria grayi*_DSM 20601 también puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:14. El polipéptido de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus faecium* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:16. El polipéptido de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus faecium* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:16. El polipéptido de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus gallinarum* EG2 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:12. El polipéptido de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus gallinarum* EG2 puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:12. El polipéptido de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus casseliflavus* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99 %, el 98 %, el 97 %, el 96 %, el 95 %, el 95 %, el 93 %, el 92 %, el 91 %, el 90 %, el 89 %, el 88 %, el 87 %, el 86 % o el 85 % con SEQ ID NO:18. El polipéptido de *mvaS* codificado por el gen *mvaS* de *Enterococcus casseliflavus* puede tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84 %, el 83 %, el 82 %, el 81 % o el 80 % con SEQ ID NO:18.

El ácido nucleico de *mvaS* puede expresarse en una célula (tal como una célula bacteriana) en un plásmido multicopia. El plásmido puede ser un plásmido de alto número de copias, un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de número medio de copias. Alternativamente, el ácido nucleico de *mvaS* puede integrarse en el cromosoma de la célula huésped. Tanto para la expresión heteróloga de un ácido nucleico de *mvaS* en un plásmido o como parte integrada del cromosoma de la célula huésped, la expresión del ácido nucleico puede estar dirigida o bien por un promotor inducible o bien por un promotor que se expresa de manera constitutiva. El promotor puede ser un controlador fuerte de la expresión, puede ser un controlador débil de la expresión, o puede ser un controlador medio de la expresión del ácido nucleico de *mvaS*.

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de acetoacetil-CoA sintasa

En un aspecto, cualquiera de las células (tales como células bacterianas) descritas en el presente documento puede contener uno o más ácido(s) nucleico(s) heterólogo(s) que codifica(n) un polipéptido de acetoacetil-CoA sintasa. El gen de acetoacetil-CoA sintasa (también denominado *nphT7*) es un gen que codifica una enzima que tiene la actividad de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA y que tiene mínima actividad (por ejemplo, ausencia de actividad) de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de dos moléculas de acetil-CoA. Véase, por ejemplo, Okamura *et al.*, PNAS vol. 107. n.º 25, págs. 11265-11270 (2010), a cuyo contenido se hace referencia expresamente en el presente documento para enseñanzas sobre *nphT7*. Un gen de acetoacetil-CoA sintasa de un actinomiceto del género *Streptomyces* cepa CL190 se describió en la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público (de tipo Kokai) n.º 2008-61506 A y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0285549. La acetoacetil-CoA sintasa también puede denominarse acetil CoA:malonil CoA aciltransferasa. Una acetoacetil-CoA sintasa (o acetil CoA:malonil CoA aciltransferasa) representativa que puede usarse es Genbank AB540131.1. En un aspecto, la acetoacetil-CoA sintasa de la presente invención sintetiza acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA mediante una reacción irreversible. El uso de acetoacetil-CoA sintasa para generar acetil-CoA proporciona la ventaja adicional de que esta reacción es irreversible mientras que la acción de la enzima acetoacetil-CoA tiolasa de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de dos moléculas de acetil-CoA es reversible. Por consiguiente, el uso de acetoacetil-CoA sintasa para sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA puede dar como resultado una ventaja significativa de la productividad para isopreno en comparación con el uso de tiolasa para generar el mismo producto final.

Además, el uso de acetoacetil-CoA sintasa para producir isopreno proporciona otra ventaja de que la acetoacetil-CoA sintasa puede convertir malonil CoA en acetil CoA mediante descarboxilación del malonil CoA. Por tanto, las

provisiones de sustrato de partida no están limitadas por las cantidades de partida de acetil CoA. La síntesis de acetoacetil-CoA por acetoacetil-CoA sintasa todavía puede producirse cuando el sustrato de partida es solo malonil-CoA. En un aspecto, la reserva de malonil-CoA de partida está aumentada usando las cepas huésped que tienen más malonil-CoA. Tales reservas aumentadas pueden producirse de manera natural o modificarse por ingeniería genética mediante manipulación molecular. Véase, por ejemplo Fowler, *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 75, n.º 18, págs. 5831-5839 (2009).

En cualquiera de las realizaciones o los aspectos descritos en el presente documento, puede usarse una enzima que tiene la capacidad para sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA. Se describen ejemplos no limitativos de una enzima de este tipo en el presente documento. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, puede usarse un gen de acetoacetil-CoA sintasa derivado de un actinomiceto del género *Streptomyces* que tiene la actividad de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA.

Un ejemplo de un gen de acetoacetil-CoA sintasa de este tipo es el gen que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19. Una proteína de este tipo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 corresponde a una acetoacetil-CoA sintasa que tiene la actividad de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA y que no tiene actividad de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de dos moléculas de acetil-CoA.

En una realización, el gen que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 puede obtenerse mediante un método de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR) con el uso de ADN genómico obtenido de un actinomiceto de *Streptomyces* sp. cepa CL190 como molde y un par de cebadores que pueden designarse con referencia a la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público (de tipo Kokai) n.º 2008-61506 A.

Tal como se describe en el presente documento, un gen de acetoacetil-CoA sintasa para su uso en la presente invención no se limita a un gen que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 de un actinomiceto de *Streptomyces* sp. cepa CL190. Cualquier gen que codifica una proteína que tiene la capacidad para sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA y que no sintetiza acetoacetil-CoA a partir de dos moléculas de acetil-CoA puede usarse en los métodos descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el gen de acetoacetil-CoA sintasa puede ser un gen que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con alta similitud o sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y que tiene la función de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA. La expresión "altamente similar" o "sustancialmente idéntica" se refiere a, por ejemplo, una identidad de al menos aproximadamente el 80 % identidad, al menos aproximadamente el 85 %, el al menos aproximadamente el 90 %, el al menos aproximadamente el 91 %, el al menos aproximadamente el 92 %, el al menos aproximadamente el 93 %, el al menos aproximadamente el 94 %, el al menos aproximadamente el 95 %, el al menos aproximadamente el 96 %, el al menos aproximadamente el 97 %, el al menos aproximadamente el 98 % y al menos aproximadamente el 99 %. Tal como se usó anteriormente, el valor de identidad corresponde al porcentaje de identidad entre residuos de aminoácido en una secuencia de aminoácidos diferente y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, que se calcula realizando la alineación de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y la secuencia de aminoácidos diferente con el uso de un programa para búsqueda para similitud de secuencias.

En otras realizaciones, el gen de acetoacetil-CoA sintasa puede ser un gen que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 mediante sustitución, delección, adición o inserción de 1 o más aminoácido(s) y que tiene la función de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA. En el presente documento, la expresión "más aminoácidos" se refiere a, por ejemplo, de 2 a 30 aminoácidos, preferiblemente de 2 a 20 aminoácidos, más preferiblemente de 2 a 10 aminoácidos, y lo más preferiblemente de 2 a 5 aminoácidos.

En todavía otras realizaciones, el gen de acetoacetil-CoA sintasa puede consistir en un polinucleótido capaz de hibridar con una parte o la totalidad de un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 en condiciones rigurosas y capaz de codificar una proteína que tiene la función de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA. En el presente documento, la hibridación en condiciones rigurosas corresponde al mantenimiento de la unión en condiciones de lavado a 60 °C con SSC 2x. La hibridación puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos de manera convencional tales como el método descrito en J. Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3.ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (2001).

Tal como se describe en el presente documento, un gen que codifica una acetoacetil-CoA sintasa que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 puede aislarse de potencialmente cualquier organismo, por ejemplo, un actinomiceto que no se obtiene de *Streptomyces* sp. cepa CL190. Además, pueden obtenerse genes de acetoacetil-CoA sintasa para su uso en el presente documento modificando un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 mediante un método conocido en la técnica. La mutagénesis de una secuencia de nucleótidos puede llevarse a cabo mediante un método conocido tal como el método Kunkel o el método dúplex con huecos o mediante un método similar a cualquiera de

los mismos. Por ejemplo, puede llevarse a cabo mutagénesis con el uso de un kit de mutagénesis (por ejemplo, nombres de producto; Mutant-K y Mutant-G (TAKARA Bio)) para mutagénesis específica de sitio, nombre de producto; un kit de la serie para mutagénesis *in vitro* LA PCR (TAKARA Bio), y similares.

5 La actividad de una acetoacetil-CoA sintasa que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 puede evaluarse tal como se describe a continuación. Específicamente, un gen que codifica una proteína que va a evaluarse se introduce en primer lugar en una célula huésped de tal manera que el gen puede expresarse en la misma, seguido por purificación de la proteína mediante una técnica tal como cromatografía. Se añaden malonil-CoA y acetil-CoA como sustratos a un tampón que contiene la proteína obtenida
10 que va a evaluarse, seguido, por ejemplo, por incubación a una temperatura deseada (por ejemplo, de 10 °C a 60 °C). Después de completarse la reacción, se determinan la cantidad de sustrato perdido y/o la cantidad de producto (acetoacetil-CoA) producido. Por tanto, es posible evaluar si la proteína que está sometiéndose a prueba tiene o no la función de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA y acetil-CoA y evaluar el grado de síntesis. En tal caso, es posible examinar si la proteína tiene o no la actividad de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de dos moléculas de acetil-CoA añadiendo acetil-CoA solo como sustrato a un tampón que contiene la proteína obtenida
15 que va a evaluarse y determinando la cantidad de sustrato perdido y/o la cantidad de producto producido de manera similar.

20 Células huésped a modo de ejemplo

Un experto en la técnica reconocerá que se diseñan vectores de expresión para que contengan determinados componentes que optimizan la expresión génica para determinadas cepas huésped. Tales componentes de optimización incluyen, pero no se limitan a origen de replicación, promotores y potenciadores. Los vectores y componentes a los que se hace referencia en el presente documento se describen con fines a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance de la invención.
25

Puede usarse cualquier microorganismo o una progenie de los mismos que puede usarse para expresar de manera heteróloga genes, para la modulación de cualquiera de los genes descritos en el presente documento para la producción aumentada de mevalonato, isopreno, moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides (por ejemplo, citrato sintasa, fosfotransacetilasa, acetato cinasa, lactato deshidrogenasa, enzima málica, piruvato deshidrogenasa, 6-fosfogluconolactonasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, el inhibidor de la actividad de RssB durante la proteína de privación de magnesio, el componente *acrA* de la bomba de eflujo de múltiples fármacos *acrAB-ToIC* y/o FNR. Además, puede usarse cualquier microorganismo o una progenie de los mismos que puede usarse para expresar de manera heteróloga genes, para expresar uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA superior. En algunos aspectos, puede usarse cualquier microorganismo o una progenie de los mismos que puede usarse para expresar de manera heteróloga genes, para expresar uno o más genes *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*). Pueden usarse células bacterianas, incluyendo bacterias gram-positivas o gram-negativas para expresar cualquiera de los genes de la ruta de MVA superior (tales como genes *mvaE* y *mvaS*)
30 descritos anteriormente. En particular, puede expresarse un gen de la ruta de MVA superior (tal como los genes *mvaE* y *mvaS*) en una cualquiera de células de *P. citrea*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *S. albus*, *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. griseus*, *Pseudomonas* sp. y *P. alcaligenes*. En algunos aspectos, la célula huésped puede ser una de *Lactobacillus spp.*, tal como *Lactobacillus lactis* o *Lactobacillus plantarum*.
35
40
45

Existen numerosos tipos de células anaerobias que pueden usarse como células huésped en las composiciones y los métodos de la presente invención. En un aspecto de la invención, las células descritas en cualquiera de las composiciones o los métodos descritos en el presente documento son células anaerobias estrictas y una progenie de las mismas. Los microorganismos anaerobios estrictos normalmente no crecen bien, si acaso lo hacen, en condiciones en las que está presente oxígeno. Ha de entenderse que puede estar presente una pequeña cantidad de oxígeno, es decir, existe cierto nivel de tolerancia que los microorganismos anaerobios estrictos tienen para un bajo nivel de oxígeno. En un aspecto, los microorganismos anaerobios estrictos modificados por ingeniería genética para producir mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides y/o isoprenoides pueden servir como células huésped para cualquiera de las composiciones y/o los métodos descritos en el presente documento y se hacen crecer en condiciones sustancialmente libres de oxígeno, en las que la cantidad de oxígeno presente no es perjudicial para el crecimiento, el mantenimiento y/o la fermentación de los microorganismos anaerobios.
50
55

En otro aspecto de la invención, las células huésped descritas y/o usadas en cualquiera de las composiciones o los métodos descritos en el presente documento son células anaerobias facultativas y una progenie de las mismas. Los microorganismos anaerobios facultativos pueden generar ATP celular mediante respiración aerobia (por ejemplo, utilización del ciclo de TCA) si está presente oxígeno. Sin embargo, los microorganismos anaerobios facultativos también pueden crecer en ausencia de oxígeno. Esto contrasta con los microorganismos anaerobios estrictos que mueren o crecen escasamente en presencia de mayores cantidades de oxígeno. En un aspecto, por tanto, los microorganismos anaerobios facultativos pueden servir como células huésped para cualquiera de las composiciones y/o los métodos proporcionados en el presente documento y pueden modificarse por ingeniería genética para
60
65

producir mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides y/o isoprenoides. Las células anaerobias facultativas huésped pueden hacerse crecer en condiciones sustancialmente libres de oxígeno, en las que la cantidad de oxígeno presente no es perjudicial para el crecimiento, el mantenimiento y/o la fermentación de los microorganismos anaerobios, o pueden hacerse crecer alternativamente en presencia de mayores cantidades de oxígeno.

La célula huésped puede ser adicionalmente una célula de hongo filamentoso y una progenie de la misma. (Véase, por ejemplo, Berka & Barnett, *Biotechnology Advances*, (1989), 7(2):127-154). En algunos aspectos, la célula de hongo filamentoso puede ser cualquiera de *Trichoderma longibrachiatum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *Penicillium sp.*, *Humicola insolens*, *H. lanuginosa*, *H. grisea*, *Chrysosporium sp.*, *C. lucknowense*, *Gliocladium sp.*, *Aspergillus sp.*, tal como *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sojae*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, o *A. awamori*, *Fusarium sp.*, tal como *F. roseum*, *F. graminum*, *F. cerealis*, *F. oxysporum*, o *F. venenatum*, *Neurospora sp.*, tal como *N. crassa*, *Hipocrea sp.*, *Mucor sp.*, tal como *M. miehei*, *Rhizopus sp.* o *Emericella sp.* En algunos aspectos, el hongo es *A. nidulans*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. japonicus*, *T. reesei*, *T. viride*, *F. oxysporum*, o *F. solani*. En determinadas realizaciones, los plásmidos o componentes plasmídicos para su uso en el presente documento incluyen los descritos en la pub. de patente estadounidense n.º US 2011/0045563.

La célula huésped también puede ser una levadura, tal como *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Pichia sp.*, o *Candida sp.* En algunos aspectos, *Saccharomyces sp.* es *Saccharomyces cerevisiae* (véase, por ejemplo, Romanos *et al.*, *Yeast*, (1992), 8(6):423-488). En determinadas realizaciones, plásmidos o componentes plasmídicos para su uso en el presente documento incluyen los descritos en la patente estadounidense n.º 7.659.097 y la pub. de patente estadounidense n.º US 2011/0045563.

La célula huésped puede ser adicionalmente una especie de alga, tal como un alga verde, alga roja, glaucofitas, clorarciniofitas, euglenidas, cromistas o dinoflagelados. (Véase, por ejemplo, Saunders & Warmbrodt, "Gene Expression in Algae and Fungi, Including Yeast", (1993), National Agricultural Library, Beltsville, MD). En determinadas realizaciones, los plásmidos o componentes plasmídicos para su uso en el presente documento incluyen los descritos en la pub. de patente estadounidense n.º US 2011/0045563. En algunos aspectos, la célula huésped es una cianobacteria, tal como cianobacteria clasificada en cualquiera de los siguientes grupos basándose en la morfología: *Chlorococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* o *Stigonematales* (véase, por ejemplo, Lindberg *et al.*, *Metab. Eng.*, (2010) 12(1):70-79). En determinadas realizaciones, los plásmidos o componentes plasmídicos para su uso en el presente documento incluyen los descritos en las pub. de patente estadounidense n.º^{OS} US 2010/0297749; US 2009/0282545 y la sol. de pat. int. n.º WO 2011/034863.

Pueden usarse células huésped de *E. coli* que se han modificado por ingeniería genética para aumentar el flujo de carbono a mevalonato para expresar uno o más polipéptidos de la ruta de MVA superior, tales como cualquiera de los polipéptidos de la ruta de MVA superior descritos en el presente documento. En algunos aspectos, pueden usarse células huésped de *E. coli* para expresar uno o más polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. En un aspecto, la célula huésped es una célula recombinante de una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*), o una progenie de la misma, capaz de producir mevalonato que expresa uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS*, tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para aumentar el flujo de carbono a mevalonato. Además, el uno o más ácidos nucleicos expresados de manera heteróloga que codifican polipéptidos de la ruta de MVA superior en *E. coli* pueden ser copias cromosómicas (por ejemplo, integrados en el cromosoma de *E. coli*). En otro aspecto, el uno o más ácidos nucleicos expresados de manera heteróloga que codifican polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) en *E. coli* pueden ser copias cromosómicas (por ejemplo, integrados en el cromosoma de *E. coli*). En otros aspectos, las células de *E. coli* están en cultivo.

Medios de cultivo celular a modo de ejemplo

Tal como se usa en el presente documento, los términos "medio mínimo" o "medios mínimos" se refieren a medio de crecimiento que contiene los mínimos nutrientes posibles para el crecimiento celular, generalmente, pero no siempre, sin la presencia de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos o más). El medio mínimo contiene normalmente: (1) una fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo (por ejemplo, célula bacteriana); (2) diversas sales, que pueden variar entre especies de microorganismo (por ejemplo, bacterianas) y condiciones de crecimiento; y (3) agua. La fuente de carbono puede variar significativamente, de azúcares simples como glucosa a hidrolizados más complejos de otra biomasa, tales como extracto de levadura, tal como se comenta en más detalle a continuación. Las sales proporcionan generalmente elementos esenciales tales

como magnesio, nitrógeno, fósforo y azufre para permitir que las células sinteticen proteínas y ácidos nucleicos. El medio mínimo también puede complementarse con agentes selectivos, tales como antibióticos, para seleccionar el mantenimiento de determinados plásmidos y similares. Por ejemplo, si un microorganismo es resistente a un determinado antibiótico, tal como ampicilina o tetraciclina, entonces puede añadirse ese antibiótico al medio para impedir que crezcan células que carecen de la resistencia. El medio puede complementarse con otros compuestos según sea necesario para seleccionar características fisiológicas o bioquímicas deseadas, tales como aminoácidos particulares y similares.

Puede usarse cualquier formulación de medio mínimo para cultivar las células huésped. Las formulaciones de medio mínimo a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, medio mínimo M9 y medio mínimo TM3. Cada litro de medio mínimo M9 contiene (1) 200 ml de sales M9 estériles (64 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g de KH_2PO_4 , 2,5 g de NaCl y 5,0 g de NH_4Cl por litro); (2) 2 ml de MgSO_4 1 M (estéril); (3) 20 ml de glucosa al 20 % (p/v) (u otra fuente de carbono); y (4) 100 μl de CaCl_2 1 M (estéril). Cada litro de medio mínimo TM3 contiene (1) 13,6 g de K_2HPO_4 ; (2) 13,6 g de KH_2PO_4 ; (3) 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; (4) 2 g de ácido cítrico monohidratado; (5) 0,3 g de citrato de amonio férrico; (6) 3,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (7) 0,2 g de extracto de levadura; y (8) 1 ml de disolución de oligoelementos 1000X; se ajusta el pH a $\sim 6,8$ y se esteriliza por filtración la disolución. Cada litro de oligoelementos 1000X contiene: (1) 40 g de ácido cítrico monohidratado; (2) 30 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; (3) 10 g de NaCl ; (4) 1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; (4) 1 g de $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; (5) 1 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; (6) 100 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; (7) 100 mg de H_3BO_3 ; y (8) 100 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; se ajusta el pH a $\sim 3,0$.

Unos medios mínimos a modo de ejemplo adicionales incluyen (1) fosfato de potasio K_2HPO_4 , (2) sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (3) ácido cítrico monohidratado $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, (4) citrato de amonio férrico $\text{NH}_4\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$, (5) extracto de levadura (de Biospringer), (6) disolución de metales traza 1000X modificada, (7) ácido sulfúrico al 50 % p/v, (8) Foamblast 882 (Emerald Performance Materiales) y (9) 3,36 ml de disolución de macrosales. Se añaden todos los componentes conjuntamente y se disuelven en H_2O desionizada y entonces se esterilizan con calor. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se ajusta el pH a 7,0 con hidróxido de amonio (al 28 %) y c.s. para enrasar. Se añaden la disolución de vitaminas y la espectinomicina después de la esterilización y el ajuste del pH.

Puede usarse cualquier fuente de carbono para cultivar las células huésped. El término "fuente de carbono" se refiere a uno o más compuestos que contienen carbono capaces de metabolizarse por una célula o un organismo huésped. Por ejemplo, el medio celular usado para cultivar las células huésped puede incluir cualquier fuente de carbono adecuada para mantener la viabilidad o el crecimiento de las células huésped. En algunos aspectos, la fuente de carbono es un hidrato de carbono (tal como monosacárido, disacárido, oligosacárido o polisacáridos), o azúcar invertido (por ejemplo, jarabe de sacarosa tratado enzimáticamente).

En algunos aspectos, la fuente de carbono incluye extracto de levadura o uno o más componentes de extracto de levadura. En algunos aspectos, la concentración de extracto de levadura es del 0,1 % (p/v), el 0,09 % (p/v), el 0,08 % (p/v), el 0,07 % (p/v), el 0,06 % (p/v), el 0,05 % (p/v), el 0,04 % (p/v), el 0,03 % (p/v), el 0,02 % (p/v) o el 0,01 % (p/v) de extracto de levadura. En algunos aspectos, la fuente de carbono incluye tanto extracto de levadura (o uno o más componentes del mismo) como otra fuente de carbono, tal como glucosa.

Los monosacáridos a modo de ejemplo incluyen glucosa y fructosa; los oligosacáridos a modo de ejemplo incluyen lactosa y sacarosa, y los polisacáridos a modo de ejemplo incluyen almidón y celulosa. Los hidratos de carbono a modo de ejemplo incluyen azúcares C6 (por ejemplo, fructosa, manosa, galactosa o glucosa) y azúcares C5 (por ejemplo, xilosa o arabinosa).

Condiciones de cultivo celular a modo de ejemplo

Se describen más adelante Materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de las células recombinantes de la invención, por ejemplo, en la sección de ejemplos. Otros Materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos celulares (por ejemplo, bacterianos) se conocen bien en la técnica. Pueden hallarse técnicas a modo de ejemplo en la publicación internacional n.º WO 2009/076676, la solicitud de patente estadounidense n.º 12/335.071 (publ. estadounidense n.º 2009/0203102), el documento WO 2010/003007, la publ. estadounidense n.º 2010/0048964, el documento WO 2009/132220, la publ. estadounidense n.º 2010/0003716, Manual of Methods for General Bacteriology Gerhardt *et al.*, eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994) o Brock en Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, segunda edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. En algunos aspectos, las células se cultivan en un medio de cultivo en condiciones que permiten la expresión de uno o más isopreno sintasa, DXP ruta (por ejemplo, DXS), IDI, ruta de MVA (por ejemplo, pero sin limitarse a, *mvaE* y/o *mvaS*), o polipéptidos de PGL codificados por un ácido nucleico insertado en las células huésped.

Pueden usarse condiciones de cultivo celular convencionales para cultivar las células (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/033646 y las referencias mencionadas en el mismo). En algunos aspectos, se hacen crecer las células y se mantienen a una temperatura, mezcla de gases y pH apropiados (tal como a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C, a de aproximadamente el 6 % a aproximadamente el 84 % de CO_2 y a un pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9). En algunos aspectos, se hacen crecer las células a 35 °C en un medio

celular apropiado. En algunos aspectos, los intervalos de pH para fermentación son de entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 9,0 (tal como de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 8,0 o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0). Pueden hacerse crecer las células en condiciones aerobias, anóxicas o anaerobias basándose en los requisitos de las células huésped. Además, pueden usarse condiciones de cultivo celular más específicas para cultivar las células. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células (por ejemplo, células bacterianas, tales como células de *E. coli*) expresan uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de mvaE y mvaS (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de mvaE y mvaS de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) bajo el control de un promotor fuerte en un plásmido con número de copias de bajo a medio y se cultivan a 34 °C.

Se describen condiciones de cultivo y modos de fermentación convencionales, tales como fermentación discontinua, semicontinua o continua que pueden usarse en la publicación internacional n.º WO 2009/076676, la solicitud de patente estadounidense n.º 12/335.071 (publ. estadounidense n.º 2009/0203102), el documento WO 2010/003007, la publ. estadounidense n.º 2010/0048964, el documento WO 2009/132220, la publ. estadounidense n.º 2010/0003716. Las fermentaciones discontinuas o semicontinuas son habituales y se conocen bien en la técnica y pueden hallarse ejemplos en Brock, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, segunda edición (1989) Sinauer Associates, Inc.

En algunos aspectos, las células se cultivan en condiciones limitadas de glucosa. Por "condiciones limitadas de glucosa" quiere decirse que la cantidad de glucosa que se añade es menor de o de aproximadamente el 105 % (tal como aproximadamente el 100 %, el 90 %, el 80 %, el 70 %, el 60 %, el 50 %, el 40 %, el 30 %, el 20 % o el 10 %) de la cantidad de glucosa que se consume por las células. En aspectos particulares, la cantidad de glucosa que se añade al medio de cultivo es aproximadamente la misma que la cantidad de glucosa que se consume por las células durante un periodo de tiempo específico. En algunos aspectos, se controla la velocidad de crecimiento celular limitando la cantidad de glucosa añadida de tal manera que las células crecen a la velocidad que puede soportarse por la cantidad de glucosa en el medio celular. En algunos aspectos, no se acumula glucosa durante el tiempo en que se cultivan las células. En diversos aspectos, las células se cultivan en condiciones limitadas de glucosa durante más de o durante aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 o 70 horas. En diversos aspectos, las células se cultivan en condiciones limitadas de glucosa durante más de o durante aproximadamente el 5, el 10, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 95 o el 100 % del intervalo de tiempo total en que se cultivan las células. Aunque no pretende limitarse a ninguna teoría particular, se cree que las condiciones limitadas de glucosa pueden permitir la regulación más favorable de las células.

En algunos aspectos, las células (tales como células bacterianas) se hacen crecer en cultivo discontinuo. Las células (tales como células bacterianas) también pueden crecer en cultivo semicontinuo o en cultivo continuo. Adicionalmente, las células (tales como células bacterianas) pueden cultivarse en medio mínimo, incluyendo, pero sin limitarse a, cualquiera de los medios mínimos descritos anteriormente. El medio mínimo puede complementarse además con glucosa al 1,0 % (p/v), o cualquier otro azúcar de seis carbonos, o menos. Específicamente, el medio mínimo puede complementarse con glucosa al 1 % (p/v), al 0,9 % (p/v), al 0,8 % (p/v), al 0,7 % (p/v), al 0,6 % (p/v), al 0,5 % (p/v), al 0,4 % (p/v), al 0,3 % (p/v), al 0,2 % (p/v) o al 0,1 % (p/v). Adicionalmente, el medio mínimo puede complementarse con extracto de levadura al 0,1 % (p/v) o menos. Específicamente, el medio mínimo puede complementarse con extracto de levadura al 0,1 % (p/v), al 0,09 % (p/v), al 0,08 % (p/v), al 0,07 % (p/v), al 0,06 % (p/v), al 0,05 % (p/v), al 0,04 % (p/v), al 0,03 % (p/v), al 0,02 % (p/v) o al 0,01 % (p/v). Alternativamente, el medio mínimo puede complementarse con extracto de levadura al 1 % (p/v), al 0,9 % (p/v), al 0,8 % (p/v), al 0,7 % (p/v), al 0,6 % (p/v), al 0,5 % (p/v), al 0,4 % (p/v), al 0,3 % (p/v), al 0,2 % (p/v) o al 0,1 % (p/v) glucosa y con 0,1 % (p/v), al 0,09 % (p/v), al 0,08 % (p/v), al 0,07 % (p/v), al 0,06 % (p/v), al 0,05 % (p/v), al 0,04 % (p/v), al 0,03 % (p/v), al 0,02 % (p/v) o al 0,01 % (p/v).

Microorganismos recombinantes capaces de dar una producción aumentada de mevalonato

Los microorganismos recombinantes (por ejemplo, células bacterianas recombinantes) descritos en el presente documento tienen la capacidad para producir mevalonato en una cantidad y/o concentración mayores que las de las mismas células sin ninguna manipulación de las diversas rutas enzimáticas descritas en el presente documento. Los microorganismos recombinantes (por ejemplo, células bacterianas) que se han modificado por ingeniería genética para lograr un modulación en las diversas rutas descritas en el presente documento para aumentar el flujo de carbono a mevalonato puede usarse para producir mevalonato. Estas células modificadas por ingeniería genética también pueden contener una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica polipéptidos de la ruta de MVA superior. En algunos aspectos, las células pueden contener una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica polipéptidos de mvaE y mvaS (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de mvaE y mvaS de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*). En un aspecto, las células recombinantes (tales como células bacterianas) descritos en el presente documento tienen la capacidad para producir mevalonato a una concentración mayor que la de las mismas células que no se han modificado por ingeniería genética para aumentar el flujo de carbono hacia mevalonato. En otros aspectos, las células recombinantes descritos en el presente documento tienen la capacidad para producir mevalonato a una concentración mayor que la de las mismas células que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica polipéptidos de mvaE y mvaS (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de mvaE y mvaS de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E.*

faecalis). En un aspecto, cualquiera de las células divulgadas en el presente documento puede cultivarse en medio mínimo. En algunos casos, la una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) es un ácido nucleico heterólogo que se integra en el cromosoma de la célula huésped. Las células (tales como células bacterianas) pueden producir más de aproximadamente 85 mg/l/h/DO de mevalonato. Alternativamente, las células (tales como células bacterianas) pueden producir más de aproximadamente 30 mg/l/h/DO, 40 mg/l/h/DO, 50 mg/l/h/DO, 60 mg/l/h/DO, 70 mg/l/h/DO, 80 mg/l/h/DO, 90 mg/l/h/DO, 100 mg/l/h/DO, 110 mg/l/h/DO, 120 mg/l/h/DO, 130 mg/l/h/DO, 140 mg/l/h/DO, 150 mg/l/h/DO, 160 mg/l/h/DO, 170 mg/l/h/DO, 180 mg/l/h/DO, 190 mg/l/h/DO o 200 mg/l/h/DO de mevalonato, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estas cifras.

Las células huésped (tales como células bacterianas) descritas en el presente documento se modifican por ingeniería genética para tener una o más mutaciones que aumentan el flujo de carbono hacia la ruta de MVA y pueden producir mayores títulos pico de mevalonato en comparación con células que no se han modificado por ingeniería genética de manera similar. Adicionalmente, las células descritas en el presente documento producen mevalonato a un mayor título pico que el de las mismas células que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior. En otro aspecto, las células (tales como células bacterianas) descritas en el presente documento producen mevalonato a un mayor título pico que el de las mismas células que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) cuando se cultivan en medio mínimo. Las células (tales como células bacterianas) pueden producir un título pico de más de aproximadamente 105 g/l de mevalonato después de 48 horas de fermentación. Alternativamente, las células (tales como células bacterianas) pueden producir un título pico de más de aproximadamente 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 180 g/l, 190 g/l, 200 g/l, 210 g/l, 220 g/l, 230 g/l, 240 g/l, 250 g/l, 260 g/l, 270 g/l, 280 g/l, 290 g/l, 300 g/l de mevalonato después de 48 horas de fermentación, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estas cifras.

Las células huésped (tales como células bacterianas) descritas en el presente documento se modifican por ingeniería genética para tener una o más mutaciones que aumentan el flujo de carbono hacia la ruta de MVA que da como resultado un mayor índice de productividad celular (CPI) para mevalonato en comparación con células que no se han modificado por ingeniería genética de manera similar. Adicionalmente, las células descritas en el presente documento tienen un mayor CPI que el de las mismas células que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior. En algunos aspectos, las células (tales como células bacterianas) descritas en el presente documento tienen un mayor CPI que el de las mismas células que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*). En un aspecto, las células pueden cultivarse en medio mínimo. Las células (tales como células bacterianas) pueden tener un CPI para mevalonato de al menos aproximadamente 4,5 (g/g). Alternativamente, las células (tales como células bacterianas) pueden tener un CPI para mevalonato de al menos aproximadamente 1 (g/g), 2 (g/g), 3 (g/g), 4 (g/g), 5 (g/g), 6 (g/g), 7 (g/g), 8 (g/g), 9 (g/g), 10 (g/g), 11 (g/g), 12 (g/g), 13 (g/g), 14 (g/g), 15 (g/g), 20 (g/g), 25 (g/g) o 30 (g/g) inclusive, así como cualquier valor numérico entre estas cifras.

Las células huésped (tales como células bacterianas) descritas en el presente documento se modifican por ingeniería genética para tener una o más mutaciones que aumentan el flujo de carbono hacia la ruta de MVA que dan como resultado un mayor rendimiento en masa de mevalonato en comparación con células que no se han modificado por ingeniería genética de manera similar. Adicionalmente, las células descritas en el presente documento tienen un mayor rendimiento en masa de mevalonato a partir de glucosa que el de las mismas células que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior. En algunos aspectos, las células (tales como células bacterianas) descritas en el presente documento tienen un mayor rendimiento en masa de mevalonato a partir de glucosa que el de las mismas células que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*). En un aspecto, las células pueden cultivarse en medio mínimo. Las células (tales como células bacterianas) pueden producir un rendimiento en masa de mevalonato a partir de glucosa de al menos aproximadamente el 38 %. Alternativamente, las células (tales como células bacterianas) pueden producir un rendimiento en masa de mevalonato a partir de glucosa de al menos aproximadamente el 25 %, el 26 %, el 27 %, el 28 %, el 29 %, el 30 %, el 31 %, el 32 %, el 33 %, el 34 %, el 35 %, el 36 %, el 37 %, el 38 %, el 39 %, el 40 %, el 41 %, el 42 %, el 43 %, el 44 %, el 45 %, el 46 %, el 47 %, el 48 %, el 49 %, el 50 % o el 55 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estas cifras.

Métodos de uso de células recombinantes (por ejemplo, células bacterianas recombinantes) para producir altas cantidades de mevalonato

También se proporcionan en el presente documento métodos para la producción de mevalonato. En algunos aspectos, el método para producir mevalonato comprende: (a) cultivar una composición que comprende células recombinantes (tales como células bacterianas) que se han modificado por ingeniería genética para aumentar el flujo

de carbono a mevalonato tal como se describe en el presente documento (incluyendo cualquiera de las células, tales como las células bacterianas descritas anteriormente), o una progenie de las mismas, capaces de producir mevalonato; y (b) producir mevalonato. En algunos aspectos, el método de producción de mevalonato comprende las etapas de cultivar cualquiera de las células recombinantes descritas en el presente documento en condiciones adecuadas para la producción de mevalonato y permitir que las células recombinantes produzcan mevalonato. En algunos aspectos, el método de producción de mevalonato comprende además una etapa de recuperación del mevalonato.

El método de producción de mevalonato también puede comprender las etapas de: (a) cultivar células que expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior; y (b) producir mevalonato. En otros aspectos, el método de producción de mevalonato puede comprender las etapas de: (a) cultivar células (tales como células bacterianas, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *E. coli*) que no tienen de manera endógena un gen *mvaE* y un gen *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) en medio mínimo, en el que las células expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de *mvaE* y un polipéptido de *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*); y (b) producir mevalonato. Adicionalmente, las células pueden producir mevalonato en concentraciones mayores que las de las mismas células que carecen de una o más copias heterólogas de un gen que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un mayor flujo de carbono hacia mevalonato. En otros aspectos, las células (tales como células bacterianas) pueden producir mevalonato en concentraciones mayores que las de las mismas células que carecen de una o más copias heterólogas de un gen que codifica un polipéptido de *mvaE* y un polipéptido de *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), cuando las células se cultivan en medio mínimo. En algunos casos, la una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior es un ácido nucleico heterólogo que se integra en el cromosoma de la célula huésped. En un aspecto, la una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de *mvaE* y *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) es un ácido nucleico heterólogo que se integra en el cromosoma de la célula huésped.

Los presentes métodos para la producción de mevalonato pueden producir más de aproximadamente 85 mg/l/h/DO de mevalonato. Alternativamente, puede producirse mevalonato en cantidades mayores de aproximadamente 30 mg/l/h/DO, 40 mg/l/h/DO, 50 mg/l/h/DO, 60 mg/l/h/DO, 70 mg/l/h/DO, 80 mg/l/h/DO, 90 mg/l/h/DO, 100 mg/l/h/DO, 110 mg/l/h/DO, 120 mg/l/h/DO, 130 mg/l/h/DO, 140 mg/l/h/DO, 150 mg/l/h/DO, 160 mg/l/h/DO, 170 mg/l/h/DO, 180 mg/l/h/DO, 190 mg/l/h/DO o 200 mg/l/h/DO de mevalonato, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estas cifras. En algunos aspectos, el método de producción de mevalonato comprende además una etapa de recuperación del mevalonato.

El método de producción de mevalonato puede comprender de manera similar las etapas de: (a) cultivar células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a mevalonato tal como se describe en el presente documento, en el que las células expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen de la ruta de MVA superior que codifica uno o más polipéptidos de la ruta de MVA superior; y (b) producir mevalonato, en el que las células producen mevalonato con un mayor título pico después de 48 horas de fermentación que el de las mismas células que carecen de una o más copias de un gen de la ruta de MVA superior que codifica uno o más polipéptidos de la ruta de MVA superior, y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de mevalonato. En otros aspectos, el método de producción de mevalonato puede comprender de manera similar las etapas de: (a) cultivar células (tales como células bacterianas) que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a mevalonato tal como se describe en el presente documento (incluyendo, pero sin limitarse a, células de *E. coli*) que no tienen de manera endógena un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de (tal como pero sin limitarse a, genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) en medio mínimo, en el que las células (tales como células bacterianas) expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de *mvaE* y un polipéptido de *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*); y (b) producir mevalonato, en el que las células (tales como células bacterianas) produce mevalonato con un mayor título pico después de 48 horas de fermentación que el de las mismas células que carecen de una o más copias heterólogas de un gen que codifica un polipéptido de *mvaE* y un polipéptido de *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de mevalonato cuando las células se cultivan en medio mínimo.

Los presentes métodos para la producción de mevalonato pueden producir un título pico de más de aproximadamente 105 g/l de mevalonato después de 48 horas de fermentación. Alternativamente, las células (tales como células bacterianas) pueden producir un título pico de más de aproximadamente 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, 150 g/l, 160 g/l, 170 g/l, 180 g/l, 190 g/l o 200 g/l de mevalonato después de 48 horas de fermentación, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estas cifras. En algunos aspectos, el método de producción de mevalonato comprende además una etapa de recuperación del mevalonato.

El método de producción de mevalonato puede comprender de manera similar las etapas de: (a) cultivar células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a mevalonato tal como se describe en el presente documento, en el que las células expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen de la ruta de MVA superior que codifica uno o más polipéptidos de la ruta de MVA superior; y (b) producir mevalonato, en el que las células tienen a CPI para mevalonato mayores que el de las mismas células que carecen de una o más copias de un gen de la ruta de MVA superior que codifica uno o más polipéptidos de la ruta de MVA superior, y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de mevalonato. En otros aspectos, el método de producción de mevalonato puede comprender de manera similar las etapas de: (a) cultivar células (tales como células bacterianas) que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono tal como se describe en el presente documento (incluyendo, pero sin limitarse a, células de *E. coli*) que no tienen de manera endógena un gen *mvaE* y un gen *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) en medio mínimo, en el que las células (tales como células bacterianas) expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de *mvaE* y un polipéptido de *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*); y (b) producir mevalonato, en el que las células (tales como células bacterianas) tienen a CPI para mevalonato mayores que el de las mismas células que carecen de una o más copias heterólogas de un gen que codifica un polipéptido de *mvaE* y un polipéptido de *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de mevalonato cuando las células se cultivan en medio mínimo.

Los presentes métodos para la producción de mevalonato puede producir mevalonato usando células con un CPI para mevalonato de al menos 4,5 (g/g). Alternativamente, las células (tales como células bacterianas) pueden tener un CPI de al menos 1 (g/g), 2 (g/g), 3 (g/g), 4 (g/g), 5 (g/g), 6 (g/g), 7 (g/g), 8 (g/g), 9 (g/g), 10 (g/g), 11 (g/g), 12 (g/g), 13 (g/g), 14 (g/g), 15 (g/g), 20 (g/g), 25 (g/g) o 30 (g/g) inclusive, así como cualquier valor numérico entre estas cifras. En algunos aspectos, el método de producción de mevalonato comprende además una etapa de recuperación del mevalonato.

Se proporcionan en el presente documento métodos de uso de cualquiera de las células descritas anteriormente para la producción potenciada de mevalonato. La producción de mevalonato por las células puede potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS*, tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y/o *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*). La producción de mevalonato puede potenciarse en aproximadamente 1 000 000 veces (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 veces, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 veces) en comparación con la producción de mevalonato por células sin la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o *mvaS*, tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de MVA.

La producción de mevalonato por células según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede potenciarse (por ejemplo, potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior. En algunos aspectos, la producción de mevalonato por las células según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede potenciarse (por ejemplo, potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican los polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*). La producción de mevalonato puede potenciarse en aproximadamente 1 000 000 veces (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 veces, o de

aproximadamente 50 a aproximadamente 200 veces) en comparación con la producción de mevalonato por células que se producen de manera natural (por ejemplo, células que no expresan uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior, por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*)).

La producción de mevalonato también puede potenciarse en al menos aproximadamente cualquiera del 5 %, el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 5000 veces, 10 000 veces, 20 000 veces, 50 000 veces, 100 000 veces, 200 000 veces, 500 000 veces o 1 000 000 de veces en comparación con la producción de mevalonato por células que se producen de manera natural o por células sin la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS*, tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de MVA.

Además, pueden usarse condiciones de cultivo celular más específicas para cultivar las células en los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el método para la producción de mevalonato puede comprender las etapas de (a) cultivar células (tales como cualquier célula modificados por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a mevalonato tal como se describe en el presente documento) en medio mínimo a 34 °C, en el que las células expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior en un plásmido con número de copias de bajo a medio y bajo el control de un promotor fuerte; y (b) producir mevalonato. En algunos aspectos, el método para la producción de mevalonato comprende las etapas de (a) cultivar células (tales como células bacterianas, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *E. coli*) que no tienen de manera endógena un gen *mvaE* y un gen *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) en medio mínimo a 34 °C, en el que las células (tales como células bacterianas) expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de *mvaE* y un polipéptido de *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) en un plásmido con número de copias de bajo a medio y bajo el control de un promotor fuerte; y (b) producir mevalonato. En algunos aspectos, el método de producción de mevalonato comprende además una etapa de recuperación del mevalonato.

Células recombinantes (tales como células bacterianas) capaces de dar una producción aumentada de isopreno

El isopreno (2-metil-1,3-butadieno) es un importante compuesto orgánico usado en una amplia gama de aplicaciones. Por ejemplo, se emplea isopreno como producto intermedio o material de partida en la síntesis de numerosas composiciones y polímeros químicos, incluyendo en la producción de caucho sintético. El isopreno es también un importante material biológico que se sintetiza de manera natural por muchas plantas y animales.

El isopreno se produce a partir de DMAPP mediante la acción enzimática de isopreno sintasa. Por tanto, sin querer restringirse a la teoría, se cree que el aumento de la producción celular de mevalonato en células (tales como células bacterianas) mediante cualquiera de las composiciones y los métodos descritos anteriormente dará como resultado de manera similar la producción de mayores cantidades de isopreno. El aumento del rendimiento molar de la producción de mevalonato a partir de glucosa se traduce en mayores rendimientos molares de precursores de isoprenoides e isoprenoides, incluyendo isopreno, producidos a partir de glucosa cuando se combina con niveles apropiados de actividad enzimática de mevalonato cinasa, fosomevalonato cinasa, difosomevalonato descarboxilasa, difosfato de isopentenilo isomerasa y otras enzimas apropiadas para la producción de isopreno e isoprenoides.

Puede realizarse la producción de isopreno usando cualquiera de las células recombinantes huésped descritas en el presente documento cuando se han manipulado una o más de las rutas enzimáticas de tal manera que se modula la actividad enzimática para aumentar el flujo de carbono hacia la producción de isopreno. Los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento que tienen diversas rutas enzimáticas manipuladas para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de mevalonato pueden usarse para producir isopreno. Cualquiera de las células recombinantes huésped que expresan una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica polipéptidos de la ruta de MVA superior incluyendo, pero sin limitarse a, un polipéptido de *mvaE* y *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) capaces de dar una producción aumentada de mevalonato descritos anteriormente también pueden ser capaces de dar una producción aumentada de isopreno. En algunos aspectos, estas células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA inferior y un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de isopreno sintasa. Como alternativa a usar genes *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) también puede usarse cualquier polipéptido conocido de la ruta de MVA (ruta de MVA superior e inferior). Polipéptidos de la ruta de MVA son bien que conoce un experto en la técnica.

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA inferior

En algunos aspectos de la divulgación, las células descritas en cualquiera de las composiciones o los métodos descritos en el presente documento comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de mevalonato (MVA) inferior. En algunos aspectos, el polipéptido de la ruta de MVA inferior es un polipéptido endógeno. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior está operativamente unido a un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior está operativamente unido a un promotor inducible. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior está operativamente unido a un promotor fuerte. En un aspecto particular, las células se modifican por ingeniería genética para que sobreexpresen el polipéptido endógeno de la ruta de MVA inferior con relación a células de tipo natural. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior está operativamente unido a un promotor débil.

La ruta de biosíntesis de mevalonato inferior comprende mevalonato cinasa (MVK), fosfomevalonato cinasa (PMK) y difosfomevalonato descarboxilasa (MVD). En algunos aspectos, la ruta de MVA inferior puede comprender además difosfato de isopentenilo isomerasa (IDI). Las células proporcionadas en el presente documento pueden comprender al menos un ácido nucleico que codifica isopreno sintasa, uno o más polipéptidos de la ruta de MVA superior y/o uno o más polipéptidos de la ruta de MVA inferior. Los polipéptidos de la ruta de MVA inferior pueden ser cualquier enzima (a) que fosforila mevalonato para dar mevalonato-5-fosfato; (b) que convierte mevalonato-5-fosfato en mevalonato-5-pirofosfato; y (c) que convierte mevalonato-5-pirofosfato en pirofosfato de isopentenilo. Más particularmente, la enzima que fosforila mevalonato para dar mevalonato-5-fosfato puede ser del grupo que consiste en polipéptido de mevalonato cinasa de *M. mazei*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *M. burtonii*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus sakei*, polipéptido de mevalonato cinasa de levadura, polipéptido de mevalonato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus pneumoniae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* y polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces CL190*. En otro aspecto, la enzima que fosforila mevalonato para dar mevalonato-5-fosfato es mevalonato cinasa de *M. mazei*.

En algunos aspectos, el polipéptido de la ruta de MVA inferior es un polipéptido heterólogo. En algunos aspectos, las células comprenden más de una copia de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior está operativamente unido a un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior está operativamente unido a un promotor inducible. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior está operativamente unido a un promotor fuerte. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior está operativamente unido a un promotor débil. En algunos aspectos, el polipéptido heterólogo de la ruta de MVA inferior es un polipéptido de *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecalis* o *Metanosarcina mazei*.

Los ácidos nucleicos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior pueden integrarse en el genoma de las células o pueden expresarse de manera estable en las células. Los ácidos nucleicos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior pueden estar adicionalmente en un vector.

También se proporcionan a continuación polipéptidos de la ruta de MVA inferior a modo de ejemplo: (i) mevalonato cinasa (MVK); (ii) fosfomevalonato cinasa (PMK); (iii) difosfomevalonato descarboxilasa (MVD); y (iv) difosfato de isopentenilo isomerasa (IDI). En particular, el polipéptido de MVK inferior puede ser del género *Metanosarcina* y, más específicamente, el polipéptido de MVK inferior puede ser de *Metanosarcina mazei*. En otros aspectos, el polipéptido de MVK inferior puede ser de *M. burtonii*. Pueden hallarse ejemplos adicionales de los polipéptidos de la ruta de MVA inferior en la publicación de solicitud de patente estadounidense 2010/0086978 a cuyo contenido se hace referencia expresamente en el presente documento en su totalidad con respecto a polipéptidos de la ruta de MVK inferior y variantes de polipéptido de la ruta de MVK inferior.

Una cualquiera de las células descritas en el presente documento pueden comprender ácido(s) nucleico(s) de IDI (por ejemplo, ácido(s) nucleico(s) endógeno(s) o heterólogo(s) que codifica(n) IDI). Los polipéptidos de difosfato de isopentenilo isomerasa (difosfato de isopentenilo delta-isomerasa o IDI) catalizan la interconversión de difosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP) (por ejemplo, conversión de IPP en DMAPP y/o conversión de DMAPP en IPP). Los polipéptidos de IDI a modo de ejemplo incluyen polipéptidos, fragmentos de polipéptidos, péptidos y polipéptidos de fusión que tienen al menos una actividad de un polipéptido de IDI. Pueden usarse métodos convencionales (tales como los descritos en el presente documento) para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptido de IDI midiendo la capacidad del polipéptido para interconvertir IPP y DMAPP *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*. Los ácidos nucleicos de IDI a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un polipéptido de IDI. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de IDI a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento así como polipéptidos y ácidos nucleicos mutantes derivados de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento.

Los polipéptidos de la ruta de MVA inferior incluyen polipéptidos, fragmentos de polipéptidos, péptidos y polipéptidos de fusión que tienen al menos una actividad de un polipéptido de la ruta de MVA inferior. Los ácidos nucleicos de la ruta de MVA inferior a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un polipéptido de la ruta de MVA inferior. Los polipéptidos de la ruta de MVA inferior y ácidos nucleicos a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento. Además, también pueden usarse variantes de polipéptidos de la ruta de MVA inferior que confieren el resultado de una mejor producción de isopreno.

En algunos aspectos, el polipéptido de la ruta de MVA inferior es un polipéptido de *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecalis* o *Metanosarcina mazei*. En algunos aspectos, el polipéptido de MVK se selecciona del grupo que consiste en polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus sakei*, polipéptido de mevalonato cinasa de levadura, polipéptido de mevalonato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus pneumoniae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* CL190, polipéptido de mevalonato cinasa de *M. burtonii* y polipéptido de mevalonato cinasa de *Metanosarcina mazei*. Puede usarse uno cualquiera de los promotores descritos en el presente documento (por ejemplo, promotores descritos en el presente documento e identificados en los ejemplos de la presente divulgación incluyendo promotores inducibles y promotores constitutivos) para dirigir la expresión de cualquiera de los polipéptidos de MVA descritos en el presente documento.

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de isopreno sintasa

En algunos aspectos de la divulgación, las células descritas en cualquiera de las composiciones o los métodos descritos en el presente documento (incluyendo células huésped que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono tal como se describe en el presente documento) comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa o un polipéptido que tiene actividad de isopreno sintasa. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido endógeno. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de isopreno sintasa está operativamente unido a un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de isopreno sintasa está operativamente unido a un promotor inducible. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de isopreno sintasa está operativamente unido a un promotor fuerte. En un aspecto particular, las células se modifican por ingeniería genética para que sobreexpresen el polipéptido de la ruta de endógeno de isopreno sintasa con relación a células de tipo natural. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de isopreno sintasa está operativamente unido a un promotor débil. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido de *Pueraria* o *Populus* o un híbrido tal como *Populus alba* × *Populus tremula*.

En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido heterólogo. En algunos aspectos, las células comprenden más de una copia de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de isopreno sintasa. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de isopreno sintasa está operativamente unido a un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de isopreno sintasa está operativamente unido a un promotor inducible. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de isopreno sintasa está operativamente unido a un promotor fuerte. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de isopreno sintasa está operativamente unido a un promotor débil.

Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa(s) pueden integrarse en el genoma de las células huésped o pueden expresarse de manera estable en las células. Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa(s) pueden estar adicionalmente en un vector.

Los ácidos nucleicos de isopreno sintasa a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un polipéptido de isopreno sintasa. Los polipéptidos de isopreno sintasa convierten difosfato de dimetilalilo (DMAPP) en isopreno. Los polipéptidos de isopreno sintasa a modo de ejemplo incluyen polipéptidos, fragmentos de polipéptidos, péptidos y polipéptidos de fusión que tienen al menos una actividad de un polipéptido de isopreno sintasa. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de isopreno sintasa a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento. Además, variantes de isopreno sintasa pueden presentar actividad mejorada tal como actividad enzimática mejorada. En algunos aspectos, una variante de isopreno sintasa tiene otras propiedades mejoradas, tales como estabilidad mejorada (por ejemplo, termoestabilidad) y/o solubilidad mejorada.

Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptido de isopreno sintasa midiendo la capacidad del polipéptido para convertir DMAPP en isopreno *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*. Puede medirse la actividad de polipéptido de isopreno sintasa en el extracto celular, por ejemplo, tal como se describe en Silver *et al.*, J. Biol. Chem. 270:13010-13016, 1995. En un ensayo a modo de ejemplo, puede

5 evaporarse DMAPP (Sigma) hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno y rehidratarse hasta una concentración de 100 mM en tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 8,2 y almacenarse a -20 °C. Para realizar el ensayo, puede añadirse una disolución de 5 µl de MgCl₂ 1 M, DMAPP 1 mM (250 µg/ml), 65 µl de tampón de extracto vegetal (PEB) (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 20 mM, glicerol al 5 % y DTT 2 mM) a 25 µl de extracto celular en un vial de espacio de cabeza de 20 ml con una tapa roscada de metal y un septo de silicio recubierto con teflón (Agilent Technologies) y cultivarse a 37 °C durante 15 minutos con agitación. La reacción puede ser extinguida añadiendo 200 µl de EDTA 250 mM y cuantificarse mediante CG/EM.

10 En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido de isopreno sintasa vegetal o una variante del mismo. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es una isopreno sintasa de *Pueraria* o una variante de la misma. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es una isopreno sintasa de *Populus* o una variante de la misma. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido de isopreno sintasa de chopo o una variante del mismo. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido de isopreno sintasa de kudzú o una variante del mismo. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido de *Pueraria* o *Populus* o un híbrido, *Populus alba* × *Populus tremula*, o una variante del mismo.

20 En algunos aspectos, el polipéptido o ácido nucleico de isopreno sintasa es de la familia *Fabaceae*, tal como la subfamilia *Faboideae*. En algunos aspectos, el polipéptido o ácido nucleico de isopreno sintasa es un polipéptido o ácido nucleico de *Pueraria montana* (kudzú) (Sharkey *et al.*, Plant Physiology 137: 700-712, 2005), *Pueraria lobata*, de chopo (tal como *Populus alba*, *Populus nigra*, *Populus trichocarpa* o *Populus alba* × *tremula* (CAC35696) (Miller *et al.*, Plant 213: 483-487, 2001), de álamo (tal como *Populus tremuloides*) (Silver *et al.*, JBC 270(22): 13010-1316, 1995), roble común (*Quercus robur*) (Zimmer *et al.*, documento WO 98/02550), o una variante de los mismos. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es una isopreno sintasa de *Pueraria montana*, *Pueraria lobata*, *Populus tremuloides*, *Populus alba*, *Populus nigra* o *Populus trichocarpa* o una variante de la misma. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es una isopreno sintasa de *Populus alba* o una variante de la misma. En algunos aspectos, el ácido nucleico que codifica la isopreno sintasa (por ejemplo, isopreno sintasa de *Populus alba* o una variante de la misma) tiene optimización de codones.

30 En algunos aspectos, el ácido nucleico o polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido o ácido nucleico que se produce de manera natural (por ejemplo, polipéptido o ácido nucleico que se produce de manera natural de *Populus*). En algunos aspectos, el ácido nucleico o polipéptido de isopreno sintasa no es un polipéptido o ácido nucleico de tipo natural o que se produce de manera natural. En algunos aspectos, el ácido nucleico o polipéptido de isopreno sintasa es una variante de un polipéptido o ácido nucleico de tipo natural o que se produce de manera natural (por ejemplo, una variante de un polipéptido o ácido nucleico de tipo natural o que se produce de manera natural de *Populus*).

40 En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es una variante. En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es una variante de una isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural. En algunos aspectos, la variante tiene actividad mejorada tal como actividad catalítica mejorada en comparación con la isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural. El aumento de actividad (por ejemplo, actividad catalítica) puede ser de al menos aproximadamente cualquiera del 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 95 %. En algunos aspectos, el aumento de actividad tal como actividad catalítica es de al menos aproximadamente cualquiera de 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces o 100 veces. En algunos aspectos, el aumento de actividad tal como actividad catalítica es de aproximadamente el 10 % a aproximadamente 100 veces (por ejemplo, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 25 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 20 veces o de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 20 veces). En algunos aspectos, la variante tiene solubilidad mejorada en comparación con la isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural. El aumento de solubilidad puede ser de al menos aproximadamente cualquiera del 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 95 %. El aumento de solubilidad puede ser de al menos aproximadamente cualquiera de 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces o 100 veces. En algunos aspectos, el aumento de solubilidad es de aproximadamente el 10 % a aproximadamente 100 veces (por ejemplo, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 25 veces, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 20 veces o de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 20 veces). En algunos aspectos, el polipéptido de isopreno sintasa es una variante de isopreno sintasa que se produce de manera natural y tiene estabilidad mejorada (tal como termoestabilidad) en comparación con la isopreno sintasa que se produce de manera natural.

65 En algunos aspectos, la variante tiene al menos aproximadamente el 10 %, el al menos aproximadamente el 20 %, el al menos aproximadamente el 30 %, el al menos aproximadamente el 40 %, el al menos aproximadamente el 50 %, el al menos aproximadamente el 60 %, el al menos aproximadamente el 70 %, el al menos aproximadamente el 80 %, el al menos aproximadamente el 90 %, el al menos aproximadamente el 100 %, el al menos aproximadamente el 110 %, el al menos aproximadamente el 120 %, el al menos aproximadamente el 130 %, el al

5 menos aproximadamente el 140 %, el al menos aproximadamente el 150 %, el al menos aproximadamente el 160 %, el al menos aproximadamente el 170 %, el al menos aproximadamente el 180 %, el al menos aproximadamente el 190 %, el al menos aproximadamente el 200 % de la actividad de una isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural. La variante puede compartir similitud de secuencia con una isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural. En algunos aspectos, una variante de una isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural puede tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente cualquiera del 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o el 99,9 % con la de la isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural. En algunos aspectos, una variante de una isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de 10 cualquiera de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 99,9 %, de aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 99 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 98 %, de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 97 % o de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 95 % con la de la isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural.

15 En algunos aspectos, la variante comprende una mutación en la isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural. En algunos aspectos, la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido, al menos una inserción de aminoácido y/o al menos una delección de aminoácido. En algunos aspectos, la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido. En algunos aspectos, el número de residuos de aminoácido diferentes entre la variante y la isopreno sintasa de tipo natural o que se produce de manera natural puede ser de uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 residuos de aminoácido o más. Las isopreno sintasas que se producen de manera natural pueden incluir cualquier isopreno sintasa de plantas, por ejemplo, isopreno sintasas de kudzú, isopreno sintasas de chopo, isopreno sintasas de roble común e isopreno sintasas de sauce. En algunos aspectos, la variante es una variante de isopreno sintasa de *Populus alba*. En algunos aspectos, la variante de isopreno sintasa de *Populus alba* tiene al menos una sustitución de aminoácido, al menos una inserción de aminoácido y/o al menos una delección de aminoácido. En algunos aspectos, la variante es una isopreno sintasa de *Populus alba* truncada. En algunos aspectos, el ácido nucleico que codifica una variante (por ejemplo, variante de isopreno sintasa de *Populus alba*) tiene optimización de codones (por ejemplo, optimización de codones basada en células huésped en las que se expresa la isopreno sintasa heteróloga). En otros aspectos, la variante de isopreno sintasa de *Populus alba* tiene al menos una sustitución de aminoácido, al menos una inserción de aminoácido y/o al menos una delección de aminoácido en el residuo de aminoácido mostrado en la tabla 2. En otro aspecto, la variante de isopreno sintasa comprende al menos una sustitución de aminoácido, al menos una delección de aminoácido y al menos una inserción de aminoácido en cualquiera de los residuos de aminoácido mostrados en la tabla 2, en la que el número de residuo de aminoácido corresponde al número de residuo de aminoácido de isopreno sintasa de *P. alba*. En un 35 aspecto, la isopreno sintasa de *P. alba* es una isopreno sintasa truncada, por ejemplo, isopreno sintasa MEA que tiene 16 aminoácidos menos que la isopreno sintasa de longitud completa.

Tabla 2: Variantes de isopreno sintasa de *P. Alba* (MEA)

A118E	E472R	S510C	D323Y	W392S
S22K	K463F	S510V	D323D	W392T
S21R	K463T	I342I	G99D	W392V
S22K	R71K	K348F	K161K	A118P
S22R	R71L	K348Y	W392A	A118Q
E58L	R71M	K348K	W392C	A118A
T481V	R71V	C437L	W392F	E41M
T481Y	R71R	T240C	S288Y	G111S
T502F	K393L	M460M	M228Y	S74Q
T381L	F542L	R461A	A3T	S74S
T381M	P538K	H424P	W392Y	K36D
T381Y	P538R	H424H	W392W	S282H
T383H	P538P	A448L	F89D	S282I
T383L	A503A	A448Q	F89E	S282W
E480I	L436I	A448V	F89F	S282Y
E480R	L436Y	G389D	E41Y	S282S
K393V	L436F	S444E	E41E	K36S
K393I	E488L	S444S	R43E	K36T
E415H	E488M	H511Y	R43L	K36W
E415V	E488T	H511H	K36E	K36Y
E415Y	E488W	R071I	K36H	K36K
R71H	E488E	R071K	K36N	
R71I	I342Y	R071L	K36P	
E58Y	C437M	K374Y	K36Q	
E135G	C437W	K374K	A453I	

A363L	C437Y	L526E	A453V	
K374Y	C437C	L526Q	A453A	
T381I	M460A	L526L	V409I	
L436L	I447T	R242G	V409T	
H254R	I447V	R242R	K161C	
H254C	I447Y	A443G	K161E	
E488C	S444D	A443Q	K161N	
E488F	G389E	A443R	K161Q	
T383Y	L376I	A443S	G99E	
K414I	L376M	S13S	G99G	
K414R	L376L	V268I	S288A	
K414S	I504F	V268V	S288C	
K414W	I504I	K161A	S288T	
E472C	E467H	V409V	W392I	
E472L	E467W	D323F	W392M	

En una realización, la isopreno sintasa de *P. alba* MEA se trunca de modo que tiene 16 aminoácidos menos que la isopreno sintasa de *P. alba* de longitud completa.

5 El polipéptido de isopreno sintasa proporcionado en el presente documento puede ser cualquiera de las isopreno sintasas o variantes de isopreno sintasa descritas en los documentos WO 2009/132220, WO 2010/124146, y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º: 2010/0086978, a cuyo contenido se hace referencia expresamente en el presente documento en su totalidad con respecto a las isopreno sintasas y variantes de isopreno sintasa.

10 Puede usarse uno cualquiera de los promotores descritos en el presente documento (por ejemplo, promotores descritos en el presente documento e identificados en los ejemplos de la presente divulgación incluyendo promotores inducibles y promotores constitutivos) para dirigir la expresión de cualquiera de las isopreno sintasas descritas en el presente documento.

15 Las isopreno sintasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, las identificadas con los n.ºs de registro de Genbank AY341431, AY316691, AY279379, AJ457070 y AY182241. Los tipos de isopreno sintasas que pueden usarse en una cualquiera de las composiciones o los métodos incluyendo los métodos de producción de microorganismos que codifican isopreno sintasas descritos en el presente documento también se describen en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO2009/076676, WO2010/003007, WO2009/132220, WO2010/031062, WO2010/031068, WO2010/031076, WO2010/013077, WO2010/031079, WO2010/148150, WO2010/124146, WO2010/078457 y WO2010/148256.

25 *Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de DXS*

En algunos aspectos de la invención, las células descritas en cualquiera de las composiciones o los métodos descritos en el presente documento (incluyendo células huésped que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono tal como se describe en el presente documento) comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de DXS u otros polipéptidos de la ruta de DXS. En algunos aspectos, las células comprenden además una copia cromosómica de un ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de DXS u otros polipéptidos de la ruta de DXS. En algunos aspectos, las células de *E. coli* comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de IDI y un polipéptido de DXS u otros polipéptidos de la ruta de DXS. En algunos aspectos, un ácido nucleico codifica el polipéptido de isopreno sintasa, el polipéptido de IDI y el polipéptido de DXS u otros polipéptidos de la ruta de DXS. En algunos aspectos, un plásmido codifica el polipéptido de isopreno sintasa, el polipéptido de IDI y el polipéptido de DXS u otros polipéptidos de la ruta de DXS. En algunos aspectos, múltiples plásmidos codifican el polipéptido de isopreno sintasa, el polipéptido de IDI y el polipéptido de DXS u otros polipéptidos de la ruta de DXS.

Los polipéptidos de DXS a modo de ejemplo incluyen polipéptidos, fragmentos de polipéptidos, péptidos y polipéptidos de fusión que tienen al menos una actividad de un polipéptido de DXS. Pueden usarse métodos convencionales (tales como los descritos en el presente documento) para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptido de DXS midiendo la capacidad del polipéptido para convertir piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato en 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*. Se describen polipéptidos y ácidos nucleicos de DXS y métodos de medición de la actividad de DXS a modo de ejemplo en más detalle en la publicación internacional n.º WO 2009/076676, la solicitud de patente estadounidense n.º 12/335.071 (publ. estadounidense n.º 2009/0203102), el documento WO 2010/003007, la publ. estadounidense n.º 2010/0048964, el documento WO 2009/132220 y la publ. estadounidense n.º 2010/0003716.

Los polipéptidos de la ruta de DXS a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a cualquiera de los siguientes polipéptidos: polipéptidos de DXS, polipéptidos de DXR, polipéptidos de MCT, polipéptidos de CMK, polipéptidos de

MCS, polipéptidos de HDS, polipéptidos y polipéptidos de HDR (por ejemplo, polipéptidos de fusión) que tienen una actividad de uno, dos o más de los polipéptidos de la ruta de DXP. En particular, los polipéptidos de la ruta de DXP incluyen polipéptidos, fragmentos de polipéptidos, péptidos y polipéptidos de fusión que tienen al menos una actividad de un polipéptido de la ruta de DXP. Los ácidos nucleicos de la ruta de DXP a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un polipéptido de la ruta de DXP. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de la ruta de DXP a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento así como polipéptidos y ácidos nucleicos mutantes derivados de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento. Se describen polipéptidos y ácidos nucleicos de la ruta de DXP y métodos de medición de la actividad de polipéptidos de la ruta de DXP a modo de ejemplo en más detalle en la publicación internacional n.º: WO 2010/148150.

Los polipéptidos de DXS a modo de ejemplo incluyen polipéptidos, fragmentos de polipéptidos, péptidos y polipéptidos de fusión que tienen al menos una actividad de un polipéptido de DXS. Pueden usarse métodos convencionales (tales como los descritos en el presente documento) para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptido de DXS midiendo la capacidad del polipéptido para convertir piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato en 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*. Se describen polipéptidos y ácidos nucleicos de DXS y métodos de medición de la actividad de DXS a modo de ejemplo en más detalle en la publicación internacional n.º WO 2009/076676, la solicitud de patente estadounidense n.º 12/335.071 (publ. estadounidense n.º 2009/0203102), el documento WO 2010/003007, la publ. estadounidense n.º 2010/0048964, el documento WO 2009/132220 y la publ. estadounidense n.º 2010/0003716.

En particular, los polipéptidos de DXS convierten piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato en 1-desoxi-d-xilulosa-5-fosfato (DXP). Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptido de DXS midiendo la capacidad del polipéptido para convertir piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*.

Los polipéptidos de DXR convierten 1-desoxi-d-xilulosa-5-fosfato (DXP) en 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptidos de DXR midiendo la capacidad del polipéptido para convertir DXP *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*.

Los polipéptidos de MCT convierten 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) en 4-(citidina-5'-difosfo)-2-metil-D-eritritol (CDP-ME). Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptidos de MCT midiendo la capacidad del polipéptido para convertir MEP *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*.

Los polipéptidos de CMK convierten 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) en 2-fosfo-4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-MEP). Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptidos de CMK midiendo la capacidad del polipéptido para convertir CDP-ME *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*.

Los polipéptidos de MCS convierten 2-fosfo-4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-MEP) en 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (ME-CPP o cMEPP). Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptidos de MCS midiendo la capacidad del polipéptido para convertir CDP-MEP *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*.

Los polipéptidos de HDS convierten 2-C-metil-D-eritritol 2, 4-ciclodifosfato en difosfato de (E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilo (HMBPP o HDMAPP). Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptidos de HDS midiendo la capacidad del polipéptido para convertir ME-CPP *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*.

Los polipéptidos de HDR convierten difosfato de (E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-ilo en difosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP). Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptidos de HDR midiendo la capacidad del polipéptido para convertir HMBPP *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*.

Organismos fuente para polipéptidos de la ruta de MVA inferior, de la ruta de isopreno sintasa, de IDI y de DXP

Pueden obtenerse ácidos nucleicos (y sus polipéptidos codificados) de la ruta de isopreno sintasa, IDI, DXP y/o la ruta de MVA inferior de cualquier organismo que contiene de manera natural ácidos nucleicos de la ruta de isopreno sintasa, IDI, DXP y/o la ruta de MVA inferior. Se forma isopreno de manera natural por una variedad de organismos, tales como bacterias, levadura, plantas y animales. Algunos organismos contienen la ruta de MVA para producir isopreno. Pueden obtenerse ácidos nucleicos de isopreno sintasa, por ejemplo, de cualquier organismo que contiene una isopreno sintasa. Pueden obtenerse ácidos nucleicos de la ruta de MVA, por ejemplo, de cualquier organismo que contiene la ruta de MVA. Pueden obtenerse ácidos nucleicos de la ruta de IDI y DXP, por ejemplo, de cualquier organismo que contiene la ruta IDI y DXP.

La secuencia de ácido nucleico de los ácidos nucleicos de isopreno sintasa, la ruta de DXP, IDI y/o la ruta de MVA puede aislarse de una bacteria, un hongo, una planta, alga o cianobacteria. Los organismos fuente a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, levaduras, tales como especies de *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*), bacterias, tal como especies de *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), o especies de *Metanosarcina* (por ejemplo, *Metanosarcina mazei*), plantas, tales como kudzú o chopo (por ejemplo, *Populus alba* o *Populus alba* × *tremula* CAC35696) o álamo (por ejemplo, *Populus tremuloides*). También se describen fuentes a modo de ejemplo para polipéptidos de isopreno sintasas, IDI y/o de la ruta de MVA que pueden usarse en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.ºs WO2009/076676, WO2010/003007, WO2009/132220, WO2010/031062, WO2010/031068, WO2010/031076, WO2010/013077, WO2010/031079, WO2010/148150, WO2010/078457 y WO2010/148256.

En algunos aspectos, el organismo fuente es una levadura, tal como *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Pichia* sp. o *Candida* sp.

En algunos aspectos, el organismo fuente es una bacteria, tal como cepas de *Bacillus* tales como *B. licheniformis* o *B. subtilis*, cepas de *Pantoea* tal como *P. citrea*, cepas de *Pseudomonas* tales como *P. alcaligenes*, cepas de *Streptomyces* tales como *S. lividans* o *S. rubiginosus*, cepas de *Escherichia* tal como *E. coli*, cepas de *Enterobacter*, cepas de *Streptococcus*, o cepas de *Archaea* tales como *Metanosarcina mazei*.

Tal como se usa en el presente documento, "el género *Bacillus*" incluye todas las especies dentro del género "*Bacillus*", tal como las conocen los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus* y *B. thuringiensis*. Se reconoce que el género *Bacillus* continúa sometiéndose a reorganización taxonómica. Por tanto, se pretende que el género incluya especies que se han reclasificado, incluyendo pero sin limitarse a organismos tales como *B. stearothermophilus*, que ahora se denomina "*Geobacillus stearothermophilus*". La producción de endosporas resistentes en presencia de oxígeno se considera la característica definidora del género *Bacillus*, aunque esta característica también se aplica a los recientemente nombrados *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus* y *Virgibacillus*.

En algunos aspectos, el organismo fuente es una bacteria gram-positiva. Los ejemplos no limitativos incluyen las cepas de *Streptomyces* (por ejemplo, *S. lividans*, *S. coelicolor* o *S. griseus*) y *Bacillus*. En algunos aspectos, el organismo fuente es una bacteria gram-negativa, tal como *E. coli* o *Pseudomonas* sp.

En algunos aspectos, el organismo fuente es una planta, tal como una planta de la familia *Fabaceae*, tal como la subfamilia *Faboideae*. En algunos aspectos, el organismo fuente es kudzú, chopo (tal como *Populus alba* × *tremula* CAC35696), álamo (tal como *Populus tremuloides*) o *Quercus robur*.

En algunos aspectos, el organismo fuente es un alga, tal como un alga verde, alga roja, glaucofitas, clorarciofitas, euglenidas, cromistas o dinoflagelados.

En algunos aspectos, el organismo fuente es una cianobacteria, tal como cianobacterias clasificadas en cualquiera de los siguientes grupos basándose en la morfología: *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* o *Stigonematales*.

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de fosfocetolasa

En algunos aspectos de la divulgación, las células recombinantes descritas en cualquiera de las composiciones o los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fosfocetolasa o un polipéptido que tiene actividad fosfocetolasa. En algunos aspectos, el polipéptido de fosfocetolasa es un polipéptido endógeno. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de fosfocetolasa está operativamente unido a un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de fosfocetolasa está operativamente unido a un promotor inducible. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de fosfocetolasa está operativamente unido a un promotor fuerte. En algunos aspectos, se usa más de un ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de fosfocetolasa (por ejemplo, 2, 3, 4 copias o más de un ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de fosfocetolasa). En un aspecto particular, las células se modifican por ingeniería genética para que sobreexpresen el polipéptido endógeno de fosfocetolasa con relación a células de tipo natural. En algunos aspectos, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de fosfocetolasa está operativamente unido a un promotor débil.

Las enzimas fosfocetolasas catalizan la conversión de xilulosa-5-fosfato en gliceraldehído-3-fosfato y fosfato de acetilo y/o la conversión de fructosa 6-fosfato en eritrosa-4-fosfato y fosfato de acetilo. En determinadas realizaciones, la enzima fosfocetolasa es capaz de catalizar la conversión de xilulosa-5-fosfato en gliceraldehído-3-fosfato y fosfato de acetilo. En otras realizaciones, la enzima fosfocetolasa es capaz de catalizar la conversión de fructosa 6-fosfato en eritrosa-4-fosfato y fosfato de acetilo. Por tanto, sin querer limitarse por la teoría, la expresión de fosfocetolasa tal como se expone en el presente documento puede dar como resultado un aumento de la

cantidad de fosfato de acetilo producido a partir de una fuente de hidrato de carbono. Este fosfato de acetilo puede convertirse en acetil-CoA que entonces puede utilizarse mediante las actividades enzimáticas de la ruta de MVA para producir mevalonato, moléculas precursoras de isoprenoides, isopreno y/o isoprenoides. Por tanto, puede aumentarse la cantidad de estos compuestos producidos a partir de un sustrato de hidrato de carbono.

5 Alternativamente, puede aumentarse la producción de acetil-P y AcCoA sin reflejarse el aumento en una mayor concentración intracelular. En determinadas realizaciones, las concentraciones intracelulares de acetil-P o acetil-CoA permanecerán inalteradas o incluso disminuirán, aunque esté teniendo lugar la reacción de fosfocetolasa.

10 Los ácidos nucleicos de fosfocetolasa a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un polipéptido de fosfocetolasa. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de fosfocetolasa a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento así como polipéptidos y ácidos nucleicos mutantes derivados de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento.

15 Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de péptido de fosfocetolasa midiendo la capacidad del péptido para convertir D-fructosa 6-fosfato o D-xilulosa-5-fosfato en acetil-P. El acetil-P puede convertirse luego en acetilhidroxamato de ferrilo, que puede detectarse de manera espectrofotométrica (Meile *et al.*, J. Bact. 183:2929-2936, 2001). Cualquier polipéptido identificado como que tiene actividad de péptido de fosfocetolasa tal como se describe en el presente documento es adecuado para su uso en la presente invención.

20 En otros aspectos, los ácidos nucleicos de fosfocetolasa a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, una fosfocetolasa aislada de *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium longum*, *Ferrimonas balearica*, *Pedobactor saltans*, *Streptomyces griseus* y/o *Nocardioopsis dassonvillei*. Se describen ejemplos adicionales de enzimas fosfocetolasas que pueden usarse en el presente documento en el documento U.S. 7.785.858.

Rutas que implican la ruta de Entner-Doudoroff

30 La ruta de Entner-Doudoroff (ED) es una alternativa a la ruta de Emden-Meyerhoff-Parnass (glicólisis de EMP). Algunos organismos, como *E. coli*, albergan ambas rutas de ED y EMP, mientras que otros solo tienen una u otra. *Bacillus subtilis* solo tiene la ruta de EMP, mientras que *Zymomonas mobilis* solo tiene la ruta de ED (Peekhaus y Conway. 1998. J. Bact. 180:3495-3502; Stulke y Hillen. 2000. Annu. Rev. Microbiol. 54, 849-880; Dawes *et al.* 1966. Biochem. J. 98:795-803).

35 La fosfogluconato deshidratasa (edd) retira una molécula de H₂O de 6-fosfo-D-gluconato para formar 2-deshidro-3-desoxi-D-gluconato 6-fosfato, mientras que la 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa (eda) cataliza una escisión aldólica (Egan *et al.* 1992. J. Bact. 174:4638-4646). Los dos genes están en un operón.

40 Los metabolitos que pueden dirigirse a la ruta de fosfocetolasa también pueden desviarse a la ruta de ED. Para evitar la pérdida de metabolito a la ruta de ED, se atenúa la actividad del gen de fosfogluconato deshidratasa (por ejemplo, el gen endógeno de fosfogluconato deshidratasa) y/o un gen de 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa (por ejemplo, el gen endógeno de 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa). Un modo de lograr la atenuación es delecionando fosfogluconato deshidratasa (edd) y/o 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa (eda). Esto puede conseguirse reemplazando uno o ambos genes por un casete de cloranfenicol o kanamicina seguido por la retirada del casete. Sin estas actividades enzimáticas, puede fluir más carbono a través de la enzima fosfocetolasa, aumentando por tanto el rendimiento de mevalonato, isopreno, moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides.

50 La actividad de fosfogluconato deshidratasa (edd) y/o 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa (eda) también puede disminuirse mediante otras manipulaciones moleculares de las enzimas. La disminución de la actividad enzimática puede ser cualquier cantidad de reducción de actividad específica o actividad total en comparación con cuando no se ha efectuado manipulación. En algunos casos, la disminución de la actividad enzimática está disminuida en al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %.

60 En algunos casos, la atenuación de la actividad del gen endógeno de fosfogluconato deshidratasa y/o el gen endógeno de 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con células que no tienen atenuada la expresión génica del gen endógeno de fosfogluconato deshidratasa y/o acetato cinasa 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolasa génica.

Rutas que implican la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato

65 *E. coli* usa la ruta de las pentosas fosfato para descomponer hexosas y pentosas y para proporcionar a las células productos intermedios para diversas rutas anabólicas. También es un productor principal de NADPH. La ruta de las

pentosas fosfato se compone de una rama oxidativa (con enzimas como glucosa 6-fosfato 1-deshidrogenasa (*zwf*), 6-fosfogluconolactonasa (*pgl*) o 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*gnd*)) y una rama no oxidativa (con enzimas tales como transcetolasa (*tktA*), transaldolasa (*talA* o *talB*), ribulosa-5-fosfato-epimerasa y (o) ribosa-5-fosfato epimerasa) (Sprenger. 1995. Arch. Microbiol. 164:324-330).

5 Para dirigir carbono hacia la enzima fosfoacetolasa, puede modularse la expresión de la rama no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (transcetolasa, transaldolasa, ribulosa-5-fosfato-epimerasa y (o) ribosa-5-fosfato epimerasa) (por ejemplo, aumento de la actividad enzimática) para permitir que fluya más carbono hacia fructosa 6-fosfato y xilulosa-5-fosfato, aumentando de ese modo la eventual producción de mevalonato, isopreno, moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides. El aumento de la actividad transcetolasa, transaldolasa, ribulosa-5-fosfato-epimerasa y (o) ribosa-5-fosfato epimerasa puede ser cualquier cantidad de aumento de actividad específica o actividad total en comparación con cuando no se ha efectuado manipulación. En algunos casos, la actividad enzimática está aumentada mediante al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 %. En algunos aspectos, la actividad de transcetolasa, transaldolasa, ribulosa-5-fosfato-epimerasa y (o) ribosa-5-fosfato epimerasa se modula aumentando la actividad de una transcetolasa, transaldolasa, ribulosa-5-fosfato-epimerasa y (o) ribosa-5-fosfato epimerasa endógena. Esto puede conseguirse reemplazando el promotor del gen endógeno de transcetolasa, transaldolasa, ribulosa-5-fosfato-epimerasa y (o) ribosa-5-fosfato epimerasa por un promotor de alta expresión de manera constitutiva sintético. Los genes que codifican transcetolasa, transaldolasa, ribulosa-5-fosfato-epimerasa y (o) ribosa-5-fosfato epimerasa también pueden clonarse en un plásmido detrás de un promotor apropiado. El aumento de la actividad de transcetolasa, transaldolasa, ribulosa-5-fosfato-epimerasa y (o) ribosa-5-fosfato epimerasa puede dar como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con células que no tienen expresión aumentada de transcetolasa, transaldolasa, ribulosa-5-fosfato-epimerasa y (o) ribosa-5-fosfato epimerasa.

Rutas que implican fosfofructocinasa

30 La fosfofructocinasa es una enzima crucial de la glicólisis que cataliza la fosforilación de fructosa 6-fosfato. *E. coli* tiene dos isozimas codificadas por *pfkA* y *pfkB*. La mayor parte de la actividad fosfofructocinasa en la célula se debe a *pfkA* (Kotlarz *et al.* 1975, Biochim. Biophys. Acta, 381:257-268).

35 Para dirigir carbono hacia la enzima fosfoacetolasa, puede modularse la expresión de fosfofructocinasa (por ejemplo, disminución de la actividad enzimática) para permitir que fluya más carbono hacia fructosa 6-fosfato y xilulosa-5-fosfato, aumentando de ese modo la eventual producción de mevalonato, isopreno, moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides. La disminución de la actividad fosfofructocinasa puede ser cualquier cantidad de reducción de actividad específica o actividad total en comparación con cuando no se ha efectuado manipulación. En algunos casos, la disminución de la actividad enzimática está disminuida en al menos aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 %. En algunos aspectos, la actividad de fosfofructocinasa se modula disminuyendo la actividad de una fosfofructocinasa endógena. Esto puede conseguirse reemplazando el promotor del gen endógeno de fosfofructocinasa por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético. El gen que codifica fosfofructocinasa también puede delecionarse. La disminución de la actividad de fosfofructocinasa puede dar como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con células que no tienen la expresión disminuida de fosfofructocinasa.

Células recombinantes (tales como células bacterianas) capaces de dar una producción aumentada de isopreno

50 Las células recombinantes descritas en el presente documento que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno tienen la capacidad para producir isopreno a una concentración mayor que la de las mismas células que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno. En un aspecto, las células recombinantes (tales como células bacterianas) descritas en el presente documento (por ejemplo, células huésped que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno tal como se describe en el presente documento) tienen la capacidad para producir isopreno a una concentración mayor que la de las mismas células que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o *mvaS*, tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior, y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa cuando se cultivan en medios mínimos. En determinados aspectos, estas células comprenden una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o *mvaS*, tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior, y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa son ácidos nucleicos heterólogos. En un aspecto, el uno o más ácidos nucleicos heterólogos se integran en el

5 cromosoma de la célula huésped. Las células pueden producir cantidades mayores en al menos el 5 % de isopreno en comparación con células productoras de isopreno que no se han modificado por ingeniería genética para aumentar el flujo de carbono a isopreno. En otros aspectos, las células (tales como células bacterianas) pueden producir cantidades mayores en al menos el 5 % de isopreno en comparación con células productoras de isopreno (tales como células bacterianas) que no comprenden los polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*). Alternativamente, las células (tales como células bacterianas) pueden producir más de aproximadamente 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, el 13 %, el 14 % o el 15 % de isopreno, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estas cifras.

10 En un aspecto de la invención, se proporcionan células tal como se reivindican que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de mevalonato (MVA) inferior, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP, y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa. En otro aspecto de la invención, se proporcionan células tal como se reivindican (tales como células bacterianas) que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de mevalonato (MVA) inferior, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP, y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa. Las células pueden comprender además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de IDI. El uno o más ácidos nucleicos heterólogos pueden estar operativamente unidos a promotores constitutivos, pueden estar operativamente unidos a promotores inducibles, o pueden estar operativamente unidos a una combinación de promotores inducibles y constitutivos. El uno o más ácidos nucleicos heterólogos adicionalmente pueden estar operativamente unidos a promotores fuertes, promotores débiles y/o promotores medios. Uno o más de los ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), un(os) polipéptido(s) de la ruta de mevalonato (MVA) inferior, un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP y un polipéptido de isopreno sintasa pueden integrarse en el genoma de las células huésped o pueden expresarse de manera estable en las células. El uno o más ácidos nucleicos heterólogos pueden estar adicionalmente en un vector.

35 En algunos aspectos de la divulgación, se proporcionan células que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de MVK de *M. burtonii* y uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa o variantes del mismo, en las que las células son capaces de producir isopreno.

40 La producción de isopreno por células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno según cualquiera de las composiciones o los métodos descritos en el presente documento puede potenciarse (por ejemplo, potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa, un(os) polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior, un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP y/o un polipéptido de la ruta de MVA superior). En otros aspectos, la producción de isopreno por las células según cualquiera de las composiciones o los métodos descritos en el presente documento puede potenciarse (por ejemplo, potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa, un(os) polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior, un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP y/o los polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*). Tal como se usa en el presente documento, producción "potenciada" de isopreno se refiere a un índice de productividad celular (CPI) aumentado para isopreno, un título aumentado de isopreno, un rendimiento en masa aumentado de isopreno y/o una productividad específica de isopreno aumentada por las células descritas mediante cualquiera de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento en comparación con células que no tienen uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa, un(os) polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior, un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP y/o los polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isopreno. La producción de isopreno puede potenciarse en de aproximadamente el 5 % a aproximadamente 1 000 000 veces. La producción de isopreno puede potenciarse en de aproximadamente el 10 % a aproximadamente 1 000 000 veces (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 veces o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200

veces) en comparación con la producción de isopreno por células que no expresan uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isopreno.

La producción de isopreno también puede potenciarse mediante en menos aproximadamente cualquiera del 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 5000 veces, 10 000 veces, 20 000 veces, 50 000 veces, 100 000 veces, 200 000 veces, 500 000 veces, o 1 000 000 veces.

Métodos de uso de células recombinantes para producir isopreno

También se proporcionan en el presente documento métodos de producción de isopreno que comprenden cultivar cualquiera de los microorganismos recombinantes que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno tal como se describe en el presente documento. En un aspecto de la divulgación, puede producirse isopreno cultivando células recombinantes (tales como células bacterianas) que comprenden la modulación en cualquiera de las rutas enzimáticas descritas en el presente documento y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o de *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), un polipéptido de la ruta de MVA inferior y un polipéptido de isopreno sintasa. En otro aspecto, puede producirse isopreno cultivando células recombinantes (tales como células bacterianas) que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o de *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), un polipéptido de la ruta de MVA inferior y un polipéptido de isopreno sintasa. Puede producirse el isopreno a partir de cualquiera de las células descritas en el presente documento y según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Cualquiera de las células puede usarse con el propósito de la producción de isopreno a partir de hidratos de carbono, incluyendo azúcares de seis carbonos tales como glucosa.

Por tanto, también se proporcionan en el presente documento métodos de producción de isopreno que comprenden cultivar células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno y que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior; y (b) producir isopreno. En otros aspectos, se proporcionan en el presente documento métodos de producción de isopreno que comprenden cultivar células (tales como células bacterianas) que comprende uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de *mvaE* y *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), en unas condiciones adecuadas para producir isopreno y (b) producir isopreno. Las células pueden comprender una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el/los polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior descrito(s) anteriormente (por ejemplo, *MVK*, *PMK*, *MVD* y/o *IDI*) y cualquiera del/de los polipéptido(s) de isopreno sintasa descrito(s) anteriormente (por ejemplo, isopreno sintasa de *Pueraria*). En algunos aspectos, las células (tales como células bacterianas) pueden ser cualquiera de las células descritas en el presente documento. También puede usarse cualquiera de las isopreno sintasas o variantes de las mismas descritas en el presente documento, cualquiera de las cepas de microorganismos (por ejemplo, bacterianas) o plantas descritas en el presente documento, cualquiera de los promotores descritos en el presente documento y/o cualquiera de los vectores descritos en el presente documento para producir isopreno usando cualquiera de las fuentes de energía (por ejemplo, glucosa o cualquier otro azúcar de seis carbonos) descritas en el presente documento. En algunos aspectos, el método de producción de isopreno comprende además una etapa de recuperación del isopreno.

En algunos aspectos, se proporciona un método para producir isopreno que comprende (a) cultivar células que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un *MKV* de *M. de burtonii* y una isopreno sintasa; y (b) producir isopreno.

En algunos aspectos, se mide la cantidad de isopreno producido en el punto de tiempo de productividad absoluta pico. En algunos aspectos, la productividad absoluta pico para las células es aproximadamente cualquiera de las cantidades de isopreno divulgadas en el presente documento. En algunos aspectos, se mide la cantidad de isopreno producido en el punto de tiempo de productividad específica pico. En algunos aspectos, la productividad específica pico para las células es aproximadamente cualquiera de las cantidades de isopreno por célula divulgadas en el presente documento. En algunos aspectos, se mide la cantidad acumulada, total de isopreno producido. En algunos aspectos, la productividad total acumulada para las células es aproximadamente cualquiera de las cantidades de isopreno divulgadas en el presente documento.

En algunos aspectos, cualquiera de las células descritas en el presente documento que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno (por ejemplo las células en cultivo) produce isopreno a más de aproximadamente cualquiera de o aproximadamente cualquiera de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 o más

5 nmoles de isopreno/gramo de células para el peso en húmedo de las células/hora (nmoles/g_{wcm}/h). En algunos aspectos, la cantidad de isopreno es de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5000 nmoles/g_{wcm}/h, tal como entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 nmoles/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 500 nmoles/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 150 y aproximadamente 500 nmoles/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 1000 nmoles/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 2000 nmoles/g_{wcm}/h, o entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 5000 nmoles/g_{wcm}/h. En algunos aspectos, la cantidad de isopreno es de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 5000 nmoles/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 5000 nmoles/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 2000 nmoles/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1000 nmoles/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 1000 nmoles/g_{wcm}/h, o entre aproximadamente 400 y aproximadamente 1000 nmoles/g_{wcm}/h.

15 En algunos aspectos, las células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno en cultivo producen isopreno a más de o aproximadamente 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 10 000, 100 000, o más ng de isopreno/gramo de células para el peso en húmedo de las células/h (ng/g_{wcm}/h). En algunos aspectos, la cantidad de isopreno es de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5000 ng/g_{wcm}/h, tal como entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 ng/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 500 ng/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 1000 ng/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 2000 ng/g_{wcm}/h o entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 5000 ng/g_{wcm}/h. En algunos aspectos, la cantidad de isopreno es de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 5000 ng/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 5000 ng/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 2000 ng/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1000 ng/g_{wcm}/h, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 1000 ng/g_{wcm}/h o entre aproximadamente 400 y aproximadamente 1000 ng/g_{wcm}/h.

25 En algunos aspectos, las células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno en cultivo produce un título acumulado (cantidad total) de isopreno de más de aproximadamente cualquiera de o aproximadamente cualquiera de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 10 000, 50 000, 100 000 mg o más de isopreno/l de caldo (mg/l de caldo, en las que el volumen de caldo incluye el volumen de las células y el medio celular). En algunos aspectos, la cantidad de isopreno es de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5000 mg/l de caldo, tal como entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 mg/l de caldo, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 500 mg/l de caldo, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 1000 mg/l de caldo, entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 2000 mg/l de caldo o entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 5000 mg/l de caldo. En algunos aspectos, la cantidad de isopreno es de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 5000 mg/l de caldo, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 5000 mg/l de caldo, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 2000 mg/l de caldo, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1000 mg/l de caldo, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 1000 mg/l de caldo o entre aproximadamente 400 y aproximadamente 1000 mg/l de caldo.

40 En algunos aspectos, el isopreno producido por las células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno en cultivo comprende al menos aproximadamente el 1, el 2, el 5, el 10, el 15, el 20 o el 25 % en volumen del gas de descarga de fermentación. En algunos aspectos, el isopreno comprende entre aproximadamente el 1 y aproximadamente el 25 % en volumen del gas de descarga, tal como entre aproximadamente el 5 y aproximadamente el 15 %, entre aproximadamente el 15 y aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 10 y aproximadamente el 20 % o entre aproximadamente el 1 y aproximadamente el 10 %.

50 Se proporcionan en el presente documento células que tienen la producción potenciada de isopreno. La producción de isopreno por las células puede potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, pero sin limitarse a, un polipéptido de mvaE y/o mvaS de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa. Tal como se usa en el presente documento, producción "potenciada" de isopreno se refiere a un índice de productividad celular (CPI) aumentado para isopreno, un título aumentado de isopreno, un rendimiento en masa aumentado de isopreno y/o una productividad específica aumentada de isopreno por las células descritas mediante cualquiera de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento en comparación con células que no tienen uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa, un(os) polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior, un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP y/o un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de mvaE y/o mvaS tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de mvaE y mvaS de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isopreno. La producción de isopreno puede potenciarse en de aproximadamente el 5 % a aproximadamente 1 000 000 veces. La producción de isopreno puede potenciarse en de aproximadamente el 10 % a aproximadamente 1 000 000 veces (por ejemplo, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente 1 000 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente

1000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 veces, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 veces) en comparación con la producción de isopreno por las células que no tienen de manera endógena uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa, un(os) polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior, un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP y/o un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y/o *mvaS* tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isopreno.

La producción de isopreno por las células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isopreno según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede potenciarse (por ejemplo, potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican el polipéptido de isopreno sintasa). La producción de isopreno puede potenciarse en de aproximadamente el 5 % a aproximadamente 1 000 000 veces. La producción de isopreno puede potenciarse en de aproximadamente el 10 % a aproximadamente 1 000 000 veces (por ejemplo, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente 1 000 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 veces, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 veces) en comparación con la producción de isopreno por las células que se producen de manera natural (por ejemplo, las células sin la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa). La producción de isopreno también puede potenciarse mediante al menos aproximadamente cualquiera del 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 5000 veces, 10 000 veces, 20 000 veces, 50 000 veces, 100 000 veces, 200 000 veces, 500 000 veces o 1 000 000 de veces en comparación con la producción de isopreno por células que se producen de manera natural o por células sin la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis* y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isopreno.

Células recombinantes (tales como células bacterianas) capaces de dar una producción aumentada de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides

Pueden producirse isoprenoides en muchos organismos de la síntesis de las moléculas precursoras de isoprenoides que son los productos finales de la ruta de MVA. Tal como se estableció anteriormente, los isoprenoides representan una clase importante de compuestos e incluyen, por ejemplo, complementos de alimentos y piensos, compuestos de aroma y olor y compuestos anticancerígenos, antipalúdicos, antifúngicos y antibacterianos.

Como clase de moléculas, los isoprenoides se clasifican basándose en el número de unidades de isopreno comprendidas en el compuesto. Los monoterpenos comprenden diez carbonos o dos unidades de isopreno, los sesquiterpenos comprenden 15 carbonos o tres unidades de isopreno, los diterpenos comprenden 20 carbonos o cuatro unidades de isopreno, los sesterterpenos comprenden 25 carbonos o cinco unidades de isopreno, etcétera. Los esteroides (que comprenden generalmente aproximadamente 27 carbonos) son los productos de isoprenoides sometidos a escisión o transposición.

Pueden producirse isoprenoides a partir de las moléculas precursoras de isoprenoides IPP y DMAPP. Estos diversos compuestos derivan de estos precursores universales bastante simples y se sintetizan por grupos de poliprenil pirofosfato sintasas conservadas (Hsieh *et al.*, Plant Physiol. Marzo de 2011;155(3):1079-90). Las diversas longitudes de cadena de estos pirofosfatos de prenilo lineales, que reflejan sus funciones fisiológicas distintivas, están determinadas en general por los sitios activos altamente desarrollados de las poliprenil pirofosfato sintasas mediante reacciones de condensación de sustratos alílicos (difosfato de dimetilalilo (C₅-DMAPP), pirofosfato de geranilo (C₁₀-GPP), pirofosfato de farnesilo (C₁₅-FPP), geranilpirofosfato de geranilo (C₂₀-GGPP)) con el número correspondiente de pirofosfatos de isopentenilo (C₅-IPP) (Hsieh *et al.*, Plant Physiol. Marzo de 2011;155(3):1079-90).

Puede realizarse la producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides usando cualquiera de las células huésped recombinantes descritas en el presente documento en las que una o más de las rutas enzimáticas se han

manipulado de tal manera que se modula la actividad enzimática para aumentar el flujo de carbono hacia la producción de isoprenoides. Además, estas células pueden expresar una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior para la producción aumentada de mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides y/o isoprenoides. En otros aspectos, estas células pueden expresar una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de mvaE y mvaS (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de mvaE y mvaS de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) para la producción aumentada de mevalonato, isopreno, precursores de isoprenoides y/o isoprenoides. Cualquiera de las células recombinantes huésped que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a mevalonato que expresan una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de mvaE y/o de mvaS tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de mvaE y mvaS de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) capaces de dar una producción aumentada de mevalonato o isopreno descritos anteriormente también puede ser capaces de dar una producción aumentada de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides. En algunos aspectos, estas células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA inferior, IDI y/o la ruta de DXP, tal como se describió anteriormente, y un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que el aumento de la producción celular de mevalonato en células (tales como células bacterianas) mediante cualquiera de las composiciones y los métodos descritos anteriormente dará como resultado de manera similar la producción de mayores cantidades de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides. El aumento del rendimiento molar de producción de mevalonato a partir de glucosa se traduce en mayores rendimientos molares de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides, incluyendo isopreno, producido a partir de glucosa cuando se combina con niveles apropiados de actividad enzimática de mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, difosfomevalonato descarboxilasa, difosfato de isopentenilo isomerasa y otras enzimas apropiadas para la producción de isopreno y isoprenoides.

Tipos de isoprenoides

Las células bacterianas de la presente invención que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a mevalonato son capaces de dar una producción aumentada de isoprenoides y las moléculas precursoras de isoprenoides DMAPP e IPP. Los ejemplos de isoprenoides incluyen, sin limitación, hemiterpenoides, monoterpénoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, sesterterpenoides, triterpenoides, tetraterpenoides y politerpenoides superiores. En algunos aspectos, el hemiterpenoide es prenol (es decir, 3-metil-2-buten-1-ol), isoprenol (es decir, 3-metil-3-buten-1-ol), 2-metil-3-buten-2-ol o ácido isovalérico. En algunos aspectos, el monoterpénico puede ser, sin limitación, pirofosfato de geranilo, eucaliptol, limoneno o pineno. En algunos aspectos, el sesquiterpenoide es pirofosfato de farnesilo, artemisinina o bisabolol. En algunos aspectos, el diterpenoide puede ser, sin limitación, geranilpirofosfato de geranilo, retinol, retinal, fitol, taxol, forskolina o afidicolina. En algunos aspectos, el triterpenoide puede ser, sin limitación, escualeno o lanosterol. El isoprenoide también puede seleccionarse del grupo que consiste en abietadieno, amorfadieno, careno, α -farneseno, β -farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, patchulol, β -pineno, sabineno, γ -terpineno, terpendeno y valenceno.

En algunos aspectos, el tetraterpenoide es licopeno o caroteno (un carotenoide). Tal como se usa en el presente documento, el término "carotenoide" se refiere a un grupo de pigmentos orgánicos que se producen de manera natural en los cloroplastos y cromoplastos de plantas, de algunos otros organismos fotosintéticos, tales como algas, en algunos tipos de hongos, y en algunas bacterias. Los carotenoides incluyen las xantófilas que contienen oxígeno y los carotenos que no contienen oxígeno. En algunos aspectos, los carotenoides se seleccionan del grupo que consiste en xantófilas y carotenos. En algunos aspectos, la xantófila es luteína o zeaxantina. En algunos aspectos, el carotenoide es α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina o licopeno.

Ácidos nucleicos heterólogos que codifican poliprenil pirofosfato sintasas polipéptidos

En algunos aspectos de la invención, las células tal como se reivindican que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides descritos en cualquiera de las composiciones o los métodos en el presente documento comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de mevalonato (MVA) inferior, tal como se describió anteriormente, así como uno o más ácidos nucleicos que codifican un(os) polipéptido(s) de poliprenil pirofosfato sintasa. El polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa puede ser un polipéptido endógeno. El ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa puede estar operativamente unido a un promotor constitutivo o puede estar operativamente unido de manera similar a un promotor inducible. El ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa adicionalmente puede estar operativamente unido a un promotor fuerte. Alternativamente, el ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa puede estar operativamente unido a un promotor débil. En particular, las células pueden modificarse por ingeniería genética para que sobreexpresen el polipéptido endógeno de poliprenil pirofosfato sintasa con relación a células de tipo natural.

En algunos aspectos, el polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa es un polipéptido heterólogo. Las células de la presente invención pueden comprender más de una copia de un ácido nucleico heterólogo que codifica un

polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa está operativamente unido a un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa está operativamente unido a un promotor inducible. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa está operativamente unido a un promotor fuerte. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa está operativamente unido a un promotor débil.

Los ácidos nucleicos que codifican un(os) polipéptido(s) de poliprenil pirofosfato sintasa pueden integrarse en el genoma de las células huésped o pueden expresarse de manera estable en las células. Los ácidos nucleicos que codifican un(os) polipéptido(s) de poliprenil pirofosfato sintasa pueden estar adicionalmente en un vector.

Los poliprenil pirofosfato sintasa ácidos nucleicos a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento de un polipéptido, péptido o polipéptido de fusión que tiene al menos una actividad de un poliprenil pirofosfato sintasa. Los polipéptidos de poliprenil pirofosfato sintasa convierten moléculas precursoras de isoprenoides en compuestos isoprenoides más complejos. Los polipéptidos de poliprenil pirofosfato sintasa a modo de ejemplo incluyen polipéptidos, fragmentos de polipéptidos, péptidos y polipéptidos de fusión que tienen al menos una actividad de un polipéptido de isopreno sintasa. Los polipéptidos y ácidos nucleicos de poliprenil pirofosfato sintasa a modo de ejemplo incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que se producen de manera natural a partir de cualquiera de los organismos fuente descritos en el presente documento. Además, variantes de poliprenil pirofosfato sintasa pueden presentar actividad mejorada tal como actividad enzimática mejorada. En algunos aspectos, una variante de poliprenil pirofosfato sintasa tiene otras propiedades mejoradas, tales como estabilidad mejorada (por ejemplo, termoestabilidad) y/o solubilidad mejorada. Los ácidos nucleicos de poliprenil pirofosfato sintasa a modo de ejemplo pueden incluir ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de poliprenil pirofosfato sintasa tales como, sin limitación, difosfato de geranilo (GPP) sintasa, pirofosfato de farnesilo (FPP) sintasa y geranilpirofosfato de geranilo (GGPP) sintasa, o cualquier otro polipéptido conocido de poliprenil pirofosfato sintasa.

En algunos aspectos de la invención, las células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides descritos en cualquiera de las composiciones o los métodos en el presente documento comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican una pirofosfato de farnesilo (FPP) sintasa. El polipéptido de FPP sintasa puede ser un polipéptido endógeno codificado por un gen endógeno. En algunos aspectos, el polipéptido de FPP sintasa está codificado por un gen de *ispA* endógeno en *E. coli*. El ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de FPP sintasa puede estar operativamente unido a un promotor constitutivo o puede estar operativamente unido de manera similar a un promotor inducible. El ácido nucleico endógeno que codifica un polipéptido de FPP sintasa adicionalmente puede estar operativamente unido a un promotor fuerte. En particular, las células pueden modificarse por ingeniería genética para que sobreexpresen el polipéptido endógeno de FPP sintasa con relación a células de tipo natural.

En algunos aspectos, el polipéptido de FPP sintasa es un polipéptido heterólogo. Las células de la presente invención pueden comprender más de una copia de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de FPP sintasa. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de FPP sintasa está operativamente unido a un promotor constitutivo. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de FPP sintasa está operativamente unido a un promotor inducible. En algunos aspectos, el ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa está operativamente unido a un promotor fuerte.

Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de FPP sintasa pueden integrarse en el genoma de las células huésped o pueden expresarse de manera estable en las células. Los ácidos nucleicos que codifican una FPP sintasa pueden estar adicionalmente en un vector.

Pueden usarse métodos convencionales para determinar si un polipéptido tiene actividad de polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa midiendo la capacidad del polipéptido para convertir IPP en isoprenoides de orden superior *in vitro*, en un extracto celular, o *in vivo*. Estos métodos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º: 7.915.026; Hsieh *et al.*, Plant Physiol. 2011 Mar;155(3):1079-90; Danner *et al.*, Phytochemistry. 12 de abril de 2011 [publicación electrónica antes de imprimir]; Jones *et al.*, J Biol Chem. 14 de marzo de 2011 [publicación electrónica antes de imprimir]; Keeling *et al.*, BMC Plant Biol. 7 de marzo de 2011;11:43; Martin *et al.*, BMC Plant Biol. 2010 Oct 21;10:226; Kumeta & Ito, Plant Physiol. Dic. de 2010;154(4):1998-2007; y Köllner & Boland, J Org Chem. 20 de agosto de 2010;75(16):5590-600.

Células recombinantes (tales como células bacterianas) capaces de dar una producción aumentada de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides

Los microorganismos recombinantes (por ejemplo, células bacterianas recombinantes) descritos en el presente documento tienen la capacidad para producir precursores de isoprenoides y/o isoprenoides en una cantidad y/o concentración mayores que las de las mismas células sin cualquier manipulación de las diversas rutas enzimáticas descritas en el presente documento. Además, las células descritas en el presente documento tienen la capacidad

para producir precursores de isoprenoides y/o isoprenoides en una cantidad y/o concentración mayores que las de las mismas células que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides y que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior, una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa. En algunos aspectos, las células descritas en el presente documento tienen la capacidad para producir precursores de isoprenoides y/o isoprenoides en una cantidad y/o concentración mayores que las de las mismas células que carecen de una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa cuando se cultivan en medios mínimos. En algunos casos, la una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) una o más copias de un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de la ruta de MVA inferior, y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa son ácidos nucleicos heterólogos que se integran en el cromosoma de la célula huésped. Las células pueden producir cantidades mayores en al menos el 5 % de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides cuando en comparación con células productoras de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides (tales como células bacterianas) que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides. En otros aspectos, las células (tales como células bacterianas) pueden producir cantidades mayores en al menos el 5 % de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides cuando en comparación con células productoras de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides (tales como células bacterianas) que no comprenden los polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*). Alternativamente, las células (tales como células bacterianas) pueden producir más de aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, el 13 %, el 14 % o el 15 % de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estas cifras.

En un aspecto de la invención, se proporcionan células tal como se reivindican que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides y/o precursores de isoprenoides que comprende uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de mevalonato (MVA) inferior, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP, y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican poliprenil pirofosfato sintasa. En otro aspecto de la invención, se proporcionan células tal como se reivindican que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de mevalonato (MVA) inferior, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP, y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican poliprenil pirofosfato sintasa. Las células pueden comprender además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de IDI. Adicionalmente, el polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa puede ser un polipéptido de FPP sintasa. El uno o más ácidos nucleicos heterólogos pueden estar operativamente unidos a promotores constitutivos, pueden estar operativamente unidos a promotores inducibles, o pueden estar operativamente unidos a una combinación de promotores inducibles y constitutivos. El uno o más ácidos nucleicos heterólogos adicionalmente pueden estar operativamente unidos a promotores fuertes, promotores débiles y/o promotores medios. Uno o más de los ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), un(os) polipéptido(s) de la ruta de mevalonato (MVA) inferior y un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP, y un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa pueden integrarse en el genoma de las células huésped o pueden expresarse de manera estable en las células. El uno o más ácidos nucleicos heterólogos pueden estar adicionalmente en un vector.

En algunos aspectos, se proporcionan células que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de MKV de *M. de burtonii* y uno o más ácidos nucleicos que codifican un poliprenil pirofosfato sintasa, en las que las células son capaces de producir isoprenoides.

Se proporcionan en el presente documento métodos de uso de cualquiera de las células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides y/o precursores de isoprenoides descritos anteriormente para la producción potenciada de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides. La producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides por las células puede potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA inferior, y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa. En otros aspectos, la producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides por las células puede potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), uno o más

ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA inferior y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa. Tal como se usa en el presente documento, la producción “potenciada” de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides se refiere a un índice de productividad celular (CPI) aumentado para la producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides, un título aumentado de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides, un rendimiento en masa aumentado de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides y/o una productividad específica aumentada de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides por las células descritas mediante cualquiera de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento en comparación con células que no tienen uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa, un(os) polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior, un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP y/o un(os) polipéptidos de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y/o *mvaS* tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides. La producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides puede potenciarse en de aproximadamente el 5 % a aproximadamente 1 000 000 veces. La producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides puede potenciarse en de aproximadamente el 10 % a aproximadamente 1 000 000 veces (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 veces o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 veces) en comparación con la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides por células sin la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS*, tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides.

La producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides por las células según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede potenciarse (por ejemplo, potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA inferior y/o uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa). En otros aspectos, la producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides por las células según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede potenciarse (por ejemplo, potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican los polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA inferior y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa). La producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides puede potenciarse en de aproximadamente el 5 % a aproximadamente 1 000 000 veces. La producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides puede potenciarse en de aproximadamente el 10 % a aproximadamente 1 000 000 veces (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 veces o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 veces) en comparación con la producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides por células que se producen de manera natural (por ejemplo, células sin la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA superior, por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS*, tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*, y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides).

La producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides también puede potenciarse mediante al menos aproximadamente cualquiera del 5 %, el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 5000 veces, 10 000 veces, 20 000 veces, 50 000 veces, 100 000 veces, 200 000 veces, 500 000 veces, o 1 000 000 de veces en comparación con la producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides mediante por células que se producen de manera natural o por células sin la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que

codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y/o *mvaS*, tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides.

5 *Métodos de uso de las células recombinantes para producir isoprenoides y/o moléculas precursoras de isoprenoides*

También se proporcionan en el presente documento métodos de producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides que comprenden cultivar microorganismos recombinantes (por ejemplo, células bacterianas recombinantes) que se han modificado por ingeniería genética en diversas rutas enzimáticas descritas en el presente documento y/o que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior incluyendo, pero sin limitarse a, un polipéptido de *mvaE* y *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), un polipéptido de la ruta de MVA inferior y un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa. Las moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides pueden producirse de cualquiera de las células descritas en el presente documento y según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Cualquiera de las células puede usarse con el propósito de producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides de hidratos de carbono, incluyendo azúcares de seis carbonos tales como glucosa.

Por tanto, se proporcionan en el presente documento métodos de producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides que comprende cultivar células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides y/o precursores de isoprenoides; y (b) producir moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides. En otros aspectos, se proporcionan en el presente documento métodos de producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides que comprenden cultivar células (tales como células bacterianas) que comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de *mvaE* y *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), en unas condiciones adecuadas para producir isopreno y (b) producir moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides. Las células pueden comprender además uno o más moléculas de ácido nucleico que codifican el/los polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior descrito(s) anteriormente (por ejemplo, MVK, PMK, MVD y/o IDI) y cualquiera de los polipéptido(s) de poliprenil pirofosfato sintasa descritos anteriormente. En algunos aspectos, las células (tales como células bacterianas) pueden ser cualquiera de las células descritas en el presente documento, cualquiera de las cepas de microorganismos (por ejemplo, bacterianas) o de plantas descritas en el presente documento, cualquiera de los promotores descritos en el presente documento y/o cualquiera de los vectores descritos en el presente documento también puede usarse para producir moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides usando cualquiera de las fuentes de energía (por ejemplo, glucosa o cualquier otros azúcares de seis carbonos) descritas en el presente documento. En algunos aspectos, el método de producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides comprende además una etapa de recuperación de las moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides.

El método de producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides pueden comprender las etapas de: (a) cultivar células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides y/o precursores de isoprenoides en el que las células expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior; y (b) producir moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides, en el que las células producen mayores cantidades de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides cuando en comparación con células productoras de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides que no comprenden una o más copias heterólogas de un gen que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides y/o precursores de isoprenoides. En otros aspectos, el método de producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides puede comprender de manera similar las etapas de: (a) cultivar células (tales como células bacterianas, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *E. coli*) que no tienen de manera endógena un gen *mvaE* y un gen *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), en el que las células (tales como células bacterianas) expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de *mvaE* y un polipéptido de *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*); y (b) producir moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides, en el que las células (tales como células bacterianas) producen mayores cantidades de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides cuando en comparación con células productoras de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides (tales como células bacterianas) que no comprenden los polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*).

Los presentes métodos para la producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides pueden producir cantidades mayores en al menos el 5 % de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides cuando en comparación con células productoras de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides y/o precursores de isoprenoides y que no comprenden uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior. En

otros aspectos, se proporcionan en el presente documento métodos para la producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides pueden producir cantidades mayores en al menos el 5 % de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides en comparación con células productoras de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides (tales como células bacterianas) que no comprenden los polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides. Alternativamente, las células (tales como células bacterianas) pueden producir más de aproximadamente el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, el 13 %, el 14 % o el 15 % de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides, inclusive. En algunos aspectos, el método de producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides comprende además una etapa de recuperación de las moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides.

Se proporcionan en el presente documento métodos de uso de cualquiera de las células que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a isoprenoides y/o precursores de isoprenoides descritos anteriormente para la producción potenciada de moléculas de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides. La producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides por las células pueden potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior, uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA inferior y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa. En otros aspectos, la producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides por las células pueden potenciarse mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* (tales como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA inferior y uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa. Tal como se usa en el presente documento, la producción "potenciada" de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides se refiere a un índice de productividad celular (CPI) aumentado para la producción de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides, un título aumentado de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides, un rendimiento en masa aumentado de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides y/o una productividad específica aumentada de precursores de isoprenoides y/o isoprenoides por las células descritas mediante cualquiera de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento en comparación con células que no tienen uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de poliprenil pirofosfato sintasa, un(os) polipéptido(s) de la ruta de MVA inferior, un(os) polipéptido(s) de la ruta de DXP y/o polipéptidos de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y/o *mvaS* tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides. La producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides puede potenciarse en de aproximadamente el 5 % a aproximadamente 1 000 000 veces. La producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides puede potenciarse en de aproximadamente el 10 % a aproximadamente 1 000 000 veces (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 veces, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 veces, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 10 000 veces, de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 veces, de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 veces, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 veces) en comparación con la producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides por células sin la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, polipéptidos de *mvaE* y/o *mvaS* tales como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides.

La producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides también puede potenciarse mediante al menos aproximadamente cualquiera del 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 5000 veces, 10 000 veces, 20 000 veces, 50 000 veces, 100 000 veces, 200 000 veces, 500 000 veces o 1 000 000 de veces en comparación con la producción de moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides por células sin la expresión de uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) y que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides.

Además, pueden usarse condiciones de cultivo celular más específicas para cultivar las células en los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en algunos aspectos, el método para la producción de moléculas

precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides comprende las etapas de (a) cultivar células (tales como células bacterianas, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *E. coli*) que se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono a la producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides que no tienen de manera endógena un gen *mvaE* y un gen *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, genes *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) a 34 °C, en el que las células (tales como células bacterianas) expresan de manera heteróloga una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de *mvaE* y un polipéptido de *mvaS* (tal como pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*) en un plásmido con número de copias de bajo a medio y bajo el control de un promotor fuerte; y (b) producir isoprenoides y/o precursores de isoprenoides. En algunos aspectos, el método de producción de isoprenoides y/o precursores de isoprenoides comprende además una etapa de recuperación de las moléculas precursoras de isoprenoides y/o isoprenoides.

Vectores

Pueden usarse vectores adecuados para cualquiera de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse vectores adecuados para optimizar la expresión de una o más copias de un gen que codifica un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o un polipéptido de *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), una isopreno sintasa, un poliprenil pirofosfato sintasa y/o uno o más polipéptidos de la ruta de MVA en microorganismos anaerobios. En algunos aspectos, el vector contiene un marcador selectivo. Los ejemplos de marcadores selectivos incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos con resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, ampicilina, carbenicilina, gentamicina, higromicina, fleomicina, bleomicina, neomicina o cloranfenicol) y/o ácidos nucleicos que confieren una ventaja metabólica, tal como una ventaja nutricional en la célula huésped. En algunos aspectos, una o más copias de un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un polipéptido de *mvaE* y/o un polipéptido de *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, polipéptidos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), una isopreno sintasa, un poliprenil pirofosfato sintasa y/o uno o más ácido(s) nucleico(s) de polipéptidos de la ruta de MVA inferior se integran en el genoma de células huésped sin un marcador selectivo.

Puede usarse uno cualquiera de los vectores caracterizados o usando en los ejemplos de la presente divulgación.

Métodos de transformación

Ácidos nucleicos que codifican una o más copias de un polipéptido de la ruta de MVA superior (por ejemplo, un ácido nucleico *mvaE* y/o de *mvaS* tal como, pero sin limitarse a, ácidos nucleicos de *mvaE* y *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y/o *E. faecalis*), isopreno sintasa y/o los polipéptidos de la ruta de MVA inferior pueden insertarse en un microorganismo usando técnicas adecuadas. Adicionalmente, pueden insertarse ácidos nucleicos de isopreno sintasa, IDI, ruta de DXP y/o poliprenil pirofosfato sintasa o vectores que los contienen, en una célula huésped (por ejemplo, una célula vegetal, una célula fúngica, una célula de levadura o una célula bacteriana descritas en el presente documento) usando técnicas convencionales para la introducción de un constructo o vector de ADN en una célula huésped, tal como transformación, electroporación, microinyección nuclear, transducción, transfección (por ejemplo, lipofección mediada o transfección mediada por DEAE-dextrina o transfección usando un virus de fago recombinante), incubación con precipitado de ADN con fosfato de calcio, bombardeo a alta velocidad con microproyectiles recubiertos con ADN y fusión de protoplastos. Se conocen técnicas de transformación generales en la técnica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel *et al.* (eds.) Capítulo 9, 1987; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor, 1989; y Campbell *et al.*, Curr. Genet. 16:53-56, 1989). Los ácidos nucleicos introducidos pueden integrarse en ADN cromosómico o mantenerse como secuencias de replicación extracromosómica. Pueden seleccionarse transformantes mediante cualquier método conocido en la técnica. Se describen métodos adecuados para seleccionar transformantes en la publicación internacional n.º WO 2009/076676, la solicitud de patente estadounidense n.º 12/335.071 (publ. estadounidense n.º 2009/0203102), el documento WO 2010/003007, la publ. estadounidense n.º 2010/0048964, el documento WO 2009/132220 y la publ. estadounidense n.º 2010/0003716.

Métodos de purificación a modo de ejemplo

En algunos aspectos, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluye además una etapa de recuperación de los compuestos producidos. En algunos aspectos, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluye además una etapa de recuperación del isopreno. En algunos aspectos, se recupera el isopreno mediante separación por absorción (véase, por ejemplo, la pub. de sol. Estadounidense n.º US 2011/0178261 A1). En algunos aspectos, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluye además una etapa de recuperación de un isoprenoide. En algunos aspectos, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluye además una etapa de recuperación del terpenoide o carotenoide.

Se describen métodos de purificación adecuados en más detalle en la publicación de solicitud de patente estadounidense US2010/0196977 A1.

La invención puede entenderse adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Construcción de la cepa de *E. coli* CMP451 (que contiene BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA), CMP452 y CMP453

10 El promotor delante del gen de citrato sintasa (*gltA*) en BL21 (Novagen) se ha reemplazado por un promotor de baja expresión constitutivo, concretamente GI1.2 (patente estadounidense 7.371.558). Se han descrito dos promotores de tipo natural para *gltA* (Wilde, R, y J. Guest. 1986. J. Gen. Microbiol. 132:3239-3251) y se insertó el promotor sintético justo después de la región a -35 del promotor distal. Se obtuvo un producto de PCR usando los cebadores UpgltACm-F (5'-TATTTAATTTTAAATCATCTAATTTGACAATCATTCAACAAAGTTGTTACAATTAACCCTCACTAAAGGGCGG-3') y DngltA1.xgiCm-R (5'-TCAACAGCTGTATCCCCGTTGAGGGTGAGTTTTGCTTTTGTATCAGCCATATATTCCACCAGCTATTTGTTAGTGAATAAAAGTGGTTGAATTATTTGCTCAGGATGTGGCATHGTCAAGGGCTAATACGACTCACTATAGGGCTCG-3') y el plásmido FRT-gb2-Cm-FRT de Gene Bridges (Heidelberg, Alemania) como molde. Se purificó el producto de PCR y se usó en una recombinación mediada por Lambda Red tal como describe el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania). Se seleccionaron varias colonias para caracterización adicional. Se amplificó por PCR la región promotora usando los cebadores gltAPromSeqF: 5'-GGCAGTATAGGCTGTTACAAAAATC-3' y gltApromSeqR: 5'-CTTGACCCAGCGTGCCTTTTCAGC-3' y, como molde, ADN extraído resuspendiendo una colonia en 30 ul de H₂O, calentando a 95 °C durante 4 min, centrifugando y usando 2 ul de ese material como molde en una reacción de 50 ul. Tras observar los resultados de secuenciación de los productos de PCR obtenidos, se guardó una colonia que albergaba cada uno de los tres promotores diferentes GI1.2, GI1.5 y GI1.6 (patente estadounidense 7.371.558) para su uso adicional ((CMP141, CMP142 y CMP143; tabla 3)

Tabla 3: Cepas de *E. coli*

Cepa	Descripción	Original
CMP141	BL21 Cm-GI1.2 gltA	BL21
CMP142	BL21 Cm-GI1.5 gltA	BL21
CMP143	BL21 Cm-GI1.6 gltA	BL21
CMP258	BL21 pgl+	BL21
CMP374	BL21 pgl+ PL.2-mKKDyl <i>ldhA::Kan</i>	MD09-314
CMP440	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl Cm-GI1.2 gltA	MD09-314
CMP441	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl Cm-GI1.5 gltA	MD09-314
CMP442	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl Cm-GI1.6 gltA	MD09-314
CMP451	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA	CMP440
CMP452	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.5 gltA	CMP441
CMP453	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.6 gltA	CMP442
CMP604	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gltA <i>ackA-pta::Cm</i>	CMP451
CMP620	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta::Cm</i> <i>ldhA::Kan</i>	CMP604
CMP635	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta</i> <i>ldhA</i>	CMP620
CMP646	BL21 attB:Cm (para restaurar LowerP) col1	BL21 (Novagen)
CMP676	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta</i> <i>ldhA</i> attB:Cm	CMP635
CMP680	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta</i> <i>ldhA</i> attB:Cm, pCHL276	CMP676
MCM521	BL21 neo-PL.2-mKKDyl	(Solicitud de patente estadounidense n.º 12/978.324)
MD09-313	BL21 pgl+ neo-PL.2-mKKDyl	CMP258
MD09-314	BL21 pgl+ PL.2-mKKDyl	MD09-313
MD491	BL21 pgl+ <i>ackA-pta::Cm</i>	CMP258

30 Se construyó la cepa MD09-313 mediante la transducción de CMP258 (véase la solicitud de patente estadounidense n.º 12/978.324) con un lisado de P1 de la cepa MCM521 (véase la solicitud de patente estadounidense n.º 12/978.324) y la selección de colonias sobre placas de Luria-Bertani que contenían kanamicina 20 ug/ml. Se preparan lisados de P1 según el método descrito en Ausubel, *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. Se retiró el marcador kanamicina usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar la cepa MD09-314.

35 Se preparó un lisado de P1 a partir de las cepas CMP141, CMP142 y CMP143 y se usó para transducir la cepa MD09-314, para formar CMP440, CMP441 y CMP442 respectivamente (tabla 3). Se retiró el marcador cloranfenicol

usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar las cepas CMP451, CMP452 y CMP453 respectivamente (tabla 3).

Ejemplo 2: Construcción de la cepa de *E. coli* CMP604 (que contiene BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gItA ML *ackA-pta::Cm*)

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contenía los genes de *ackA-pta* interrumpidos por un marcador cloranfenicol usando la cepa Triple Triple en la que estaba todavía el marcador cloranfenicol (documento US 7.745.184 B2) como molde y los cebadores *ackACF* (5'-GTGCAAATTCACAACCTCAGCGG) y *ptaCR* (CACCAACGTATCGGGCAT TGCC-3'). Se usó el producto de PCR obtenido en una reacción de recombinación tal como recomienda el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para integrar el producto de PCR en el locus de *ackA-pta* en la cepa CMP258 (véase la solicitud de patente estadounidense n.º 12/978.324). Se seleccionaron colonias sobre LB + 5 ug/ml de cloranfenicol. Se recogió una colonia y se nombró como MD491. Se preparó un lisado de P1 de MD491 y se usó para transducir la cepa CMP451. Se seleccionaron colonias sobre LB + 5 ug/ml de cloranfenicol. Se recogió una colonia y se nombró como CMP604.

Ejemplo 3: Construcción de la cepa de *E. coli* CMP620 (que contiene BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gItA ML *ackA-pta::Cm* *ldhA::Kan*) y CMP635 (que contiene BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gItA ML *ackA-pta* *ldhA*)

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contenía el gen *ldhA* interrumpido por un marcador kanamicina usando la cepa JW 1375 de la colección Keio (Baba *et al.* 2006. Mol. Syst. Biol. 2: 2006,0008) como molde, y los cebadores *ldhAseqR* (5'-GGCTTACCGTTTACGCTTCCAGC-3') y *ldhAseqF2* (5'-CTAATGCAATACGTGTCCCGAGC-3'). Se usó el producto de PCR obtenido en una reacción de recombinación tal como recomienda el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para integrar el producto de PCR en el locus de *ldhA* en la cepa MD09-313. Se seleccionaron colonias sobre LB + 20 ug/ml de kanamicina. Se recogió una colonia y se nombró como CMP374. Se preparó un lisado de P1 de CMP374 y se usó para transducir CMP604. Se seleccionaron colonias sobre LB + 20 ug/ml de kanamicina. Se recogió una colonia y se nombró como CMP620. Se retiraron simultáneamente los marcadores cloranfenicol y kanamicina mediante electroporación de pCP20 (Datsenko y Wanner. 2000. PNAS 97:6640-5) en la cepa, selección de dos colonias sobre LB + carbenicilina 50 ug/ml a 30 °C y luego siembra en estrías de esas colonias sobre una placa de LB a 42 °C. Se seleccionaron una colonia de Cm^s y Kan^s a partir de esas placas y se denominaron CMP635.

Ejemplo 4: Construcción de la cepa de *E. coli* CMP676 (que contiene BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gItA ML *ackA-pta* *ldhA* *attB::Cm*)

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contenía un marcador cloranfenicol flanqueado por ADN homólogo a las regiones en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de sitio de unión de λ attB usando el plásmido pKD3 (Datsenko & Wanner, 2000, PNAS 97:6640-5) como molde, y los cebadores CMP171 (5'-AAAATTTTCTATTCTGTGACAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTACATGGAGTTGGCAGGATGTTTGA TTACATGGGAATTAGCCATGGTCC-3') y CMP172 (5'-GACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGGCATTTT TCTTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'). Se usó el producto de PCR obtenido en una reacción de recombinación en BL21 (Novagen) tal como recomienda el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para integrar el producto de PCR en el sitio de unión de λ attB. Se generó de ese modo la cepa CMP646, se seleccionó sobre LB + cloranfenicol 5 ug/ml. Se preparó un lisado de P1 de CMP646 y se usó en una reacción de transducción en la cepa CMP635, retirando de ese modo la ruta de mevalonato inferior (mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, difosfomevalonato descarboxilasa y difosfato de isopentenilo isomerasa) del cromosoma de esa cepa. Se sembró en placa la reacción de transducción sobre LB + cloranfenicol 5 ug/ml y se recogió una colonia y se nombró como CMP676.

Ejemplo 5: Construcción de la cepa de *E. coli* CMP680 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gItA ML *ackA-pta* *ldhA* *attB::Cm*, pCHL276) y detección de mevalonato

Se introdujo el plásmido pCHL276 (véase el ejemplo 6 (iii)) en CMP676 mediante electroporación. Se seleccionaron colonias sobre LB + espectinomicina 50 ug/ml. Se recogió una colonia y se nombró como CMP680.

(i) *Ensayo de rendimiento de mevalonato*

Se inocularon cultivos durante la noche de las cepas identificadas anteriormente en tubos de agitación que contenían 2 ml de caldo LB complementado con espectinomicina 50 μ g/ml (Novagen). Entonces se incubaron los cultivos durante 14 h a 34 °C a 250 rpm. A continuación, se diluyeron los cultivos en una placa de 48 pocillos de 5 ml (Axygen Scientific) que contenía 2 ml de medio TM3 complementado con glucosa al 1 %, el extracto de levadura hasta una concentración final del 0,1 % e IPTG 200 μ M hasta una DO final de 0,2. Se selló la placa con una membrana Breath Easier (Diversified Biotech) y se incubó a 34 °C en un agitador/incubador Shel Lab a 600 rpm durante 24 horas. Se centrifugó 1 ml de cada cultivo a 3000 \times g durante 5 min. Se añadieron 250 μ l de sobrenadante

a 19 µl de ácido sulfúrico al 20 % y se incubaron sobre hielo durante 5 min. Entonces se centrifugó la mezcla durante 5 min a 3000 × g y se recogió el sobrenadante para el análisis de HPLC. Se transfirieron 200 µl de sobrenadante a una placa de polipropileno de fondo cónico de 96 pocillos compatible con HPLC (Nunc). Se determinó la concentración de mevalonato en las muestras mediante comparación con una curva patrón de mevalonato (Sigma). Se midió la concentración de glucosa realizando un ensayo de glucosa oxidasa según las especificaciones del fabricante (Pointe Scientific, Inc.)

(ii) *Detección por HPLC de mevalonato:*

Se realizó el análisis de HPLC en un sistema de HPLC de la serie Agilent 1100 que contenía un detector de índice de refracción usando una columna de exclusión iónica de BioRad - Aminex HPX-87H de 300 mm × 7,8 mm (n.º de catálogo 125-0140) incubada a 50 °C y equipada con un recambio de BioRad - Microguard Cation H de 30 mm × 4,6 mm (n.º de catálogo 125-0129). Se ejecutaron las muestras a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min en tampón de ejecución de ácido sulfúrico 0,01 N. Se detectó mevalonato usando un detector de índice de refracción.

Ejemplo 6: Construcción de las cepas de *E. coli* MCM1373-1377 que expresan los genes *mvaE* y *mvaS* de *Listeria grayi* DSM 20601, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* EG2 y *Enterococcus casseliflavus*

(i) *Identificación y selección de genes*

Se realizó una búsqueda de homología de secuencia primaria usando el producto del gen *mvaE* de *E. faecalis* como consulta usando el programa BLASTp ubicado en el sitio web del NCBI (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Se seleccionaron secuencias de interés a partir de los resultados de búsqueda.

En general, las secuencias de interés para los genes de *mvaE* y *mvaS* presentaban desde el 59-66 % de identidad de secuencia de nucleótidos (con codones optimizados; véase la tabla 4) y entre el 59-71 % de identidad de secuencia de aminoácidos (tabla 5) en comparación con las secuencias de ácido nucleico y proteína de *mvaE* y *mvaS* de *E. faecalis* de tipo natural, respectivamente.

Tabla 4: Porcentaje de identidad de nucleótidos de *mvaE* y *mvaS* (con codones optimizados) en comparación con *Enterococcus faecalis* WT

Especie	Gen <i>mvaE</i> (% de identidad)	Gen <i>mvaS</i> (% de identidad)
<i>Listeria grayi</i>	62	64
<i>Enterococcus faecium</i>	60	59
<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2	60	65
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	60	66

Tabla 5: Porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos de *mvaE* y *mvaS* en comparación con *Enterococcus faecalis* WT

Especie	Gen <i>mvaE</i> (% de identidad)	Gen <i>mvaS</i> (% de identidad)
<i>Listeria grayi</i>	59	70
<i>Enterococcus faecium</i>	61	60
<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2	60	69
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	59	71

(ii) *Plásmidos pDW83, pMCM1223-pMCM1225*

Se optimizaron las secuencias codificantes de *MvaE* y *MvaS* de *Enterococcus casseliflavus* EC10 para su expresión en *Escherichia coli* (GeneOracle), y se subclonaron en el vector de expresión MCM82 (publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US2010/0196977, parr. [1023]) para producir pDW83. Específicamente, se cortó el casete que albergaba el operón de *mvaES* del vector de clonación GcD126 (GeneOracle) usando las enzimas de restricción *BglII* y *PmeI* (Roche) usando técnicas de biología molecular convencionales. Entonces se ligó este fragmento (Roche Rapid Ligation) en MCM82 que se había sometido previamente a digestión por restricción usando las enzimas *BamHI* y *PmeI* (Roche) seguido por separación en gel de agarosa (Invitrogen E-Gel) para retirar el casete de expresión que codifica *mvaES* de *Enterococcus faecalis* usando técnicas de biología molecular convencionales. Se transformó la mezcla de ligación en células Top10 químicamente competentes (Invitrogen) según el protocolo recomendado por el fabricante. Se hicieron crecer transformantes positivos resistentes a espectinomicina en medio LB líquido, y se purificaron los plásmidos (Qiagen Miniprep) y se verificaron mediante secuenciación (Quintara Biosciences) usando los cebadores Ec Seq 1F a 4R (tabla 6).

Tabla 6: Cebadores de secuenciación

Ec Seq 1F	5'-GGGTATGAAAGCGATTCTGA-3'
Ec Seq 2F	5'-AGCCCAAGGCGCTATTACCG-3'
Ec Seq 3F	5'-GGATTAGTTCAAATTTGGC-3'
Ec Seq 4F	5'-CGGTTAATGGCACGTTATGA-3'
Ec Seq 1R	5'-TCGTTTCGCCTGTAACTGCT-3'
Ec Seq 2R	5'-TGCTCTATTTTCAGTACCTTT-3'
Ec Seq 3R	5'-TGTAAGTTTCAGGCCACGCC-3'
Ec Seq 4R	5'-CCTCAGCCTTGTGTAATAA-3'

GeneOracle (Mountain View, CA) construyó plásmidos que codificaban *MvaE* y *MvaS* de *Enterococcus faecium*, *Listeria grayi* y *Enterococcus gallinarum* usando el diseño en la tabla 7. Se creó un ADN sintético que codificaba mvaE-RBS-mvaS y entonces se clonó en pMCM82 entre los sitios NcoI y PstI, reemplazando al operón existente. El vector proporcionó un RBS para *mvaE*.

Tabla 7: Diseño de los plásmidos pMCM1223 - pMCM1225 que codifican *MvaE* y *MvaS* de *Enterococcus faecium*, *Listeria grayi* y *Enterococcus gallinarum*

Identificador de plásmido	Nombre de plásmido	Organismo fuente	<i>MvaE</i>	<i>MvaS</i>	Origen y selección
pMCM1223	pCL-Ptrc-Upper_GcM M_161 (<i>Listeria grayi</i> DSM 20601)	<i>L. grayi</i> , DSM 20601	gi 229554876 ref ZP_04442665.1 acetil-CoA acetiltransferasa/hidroximetil glutaril-CoA reductasa, degradativa [<i>Listeria grayi</i> DSM 20601]	gi 229554877 ref ZP_04442666.1 hidroximetilglutaril-CoA sintasa [<i>Listeria grayi</i> DSM 20601]	pSC101, espectinomicina (50 ug/ml)
pMCM1224	pCL-Ptrc-Upper_GcM M_162 (<i>Enterococcus faecium</i>)	<i>E. faecium</i>	gi 9937391 gb AAG02444.1 AF290094_2 acetil-CoA acetiltransferasa/HMG-CoA reductasa [<i>Enterococcus faecium</i>]	gi 9937390 gb AA G02443.1 AF29009 4_1 HMG-CoA sintasa [<i>Enterococcus faecium</i>]	pSC101, espectinomicina (50 ug/ml)
pMCM1225	pCL-Ptrc-Upper_GcM M_163 (<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2)	<i>E. gallinarum</i> EG2	gi 257869528 ref ZP_056491 81.1 acetil-CoA acetiltransferasa/hidroximetil glutaril-CoA reductasa [<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2]	gi 257869527 ref ZP_05649180.1 hidroximetilglutaril-CoA sintasa [<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2]	pSC101, espectinomicina (50 ug/ml)

(iii) Construcción de pCL_pTrc-Upper (*E. faecalis*)-sin líder (pCHL276)

Se diseñaron los cebadores (CL483F: 5'-AGGAGGAATAAACCATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGCATTAC-3'; CL484R: 5'-ACTACTGTTTTTCATGGTTTATTCCTCCTTATTTAATCGATAC-3') para retirar un RBS extra en pCL_pTrc-Upper (*E. faecalis*), el plásmido MCM82. La reacción PCR consistía en ADN molde, MCM82 (100 ng), 50 uM de cada cebador directo e inverso, 1 ul de dNTP 10 mM (Roche), 5 ul de tampón de reacción 10X PfuII (Agilent), 1 ul de enzima de fusión Pfu II (Agilent) y 40 ul de agua. Se realizaron dieciocho ciclos con un perfil de temperatura de 50 segundos a 95 °C, y 50 segundos a 60 °C, y 9 min a 68 °C y una extensión de 10 min adicional a 68 °C en un termociclador de Bio-Rad. Se añadió DpnI (1 ul) tras la finalización de la reacción PCR y se incubó a 37 °C durante dos horas para retirar el ADN molde. Se añadió 1 ul adicional de DpnI y se incubó a 37 °C durante la noche. Se transformaron dos microlitros de la reacción en células TOP10 (Invitrogen) y placa de LB + espectinomicina 50 µg/ml. Se confirmó el clon correcto mediante secuenciación.

(iv) Construcción de pCL_pTrc-Upper (*E. casseliflavus*)-sin líder (pCHL277)

Se diseñaron los cebadores (CL485F: 5'-AGGAGGAATAAACCATGGAAGAAGTTGTCATCATTGACGCAC-3'; CL486R: 5'-ACTTCTTCCATGGTTTATTCCTCCTTATTTAATCG-3') para retirar el RBS extra en pCL_pTrc-Upper (*E. casseliflavus*), plásmido pDW83. La reacción PCR consistía en ADN molde, pDW83 (100 ng), 50 uM de cada cebador directo (CL483F) e inverso (CL484R), 1 ul de dNTP 10 mM (Roche), 5 ul de tampón de reacción de 10X Pfu II (Agilent), 1 ul de enzima de fusión Pfu II (Agilent) y 40 ul de agua. Se realizaron dieciocho ciclos con un perfil de temperatura de 50 segundos a 95 °C, y 50 segundos a 60 °C, y 9 min a 68 °C y una extensión de 10 min adicional a 68 °C en un termociclador Bio-Rad. Se añadió DpnI (1 ul) tras la reacción PCR y se incubó a 37 °C durante dos horas para retirar el ADN molde. Se añadió 1 ul adicional de DpnI y se incubó a 37 °C durante la noche. Se transformaron dos microlitros de la reacción en células TOP10 (Invitrogen) y placa de LA/espec50. Se confirmó el clon correcto mediante secuenciación.

(v) *Construcción de las cepas con alto rendimiento de producción de MVA MCM1373-1377*

Se hizo crecer el huésped CMP676 hasta fase semilogarítmica en LB a 37 °C y se preparó para la electroporación lavando 3x en la mitad del volumen de cultivo de ddH₂O con hielo y se resuspendió en un décimo del volumen de cultivo del mismo. Se combinaron 100 ul de la suspensión celular con 1 ul de ADN de plásmido, se trasladaron a una cubeta de electroporación de 2 mm, se sometieron a electroporación a 25 uFD, 200 ohmios, 2,5 kV, y se extinguieron inmediatamente con 500 ul de LB. Se recuperaron las células agitando a 37 °C durante 1 h y luego se seleccionaron los transformantes durante la noche en placas de LB con espectinomicina 50 ug/ml a 37 °C. Se hicieron crecer colonias individuales en LB + espectinomicina 50 ug/ml a 37 °C hasta DO₆₀₀ ~1. Se mezclaron 500 ul de caldo con 1 ml de glicerol al 50 % y se congelaron sobre hielo seco. Se almacenaron las disoluciones madre congeladas a -80 °C.

Ejemplo 7: Examen de los parámetros de productividad de mevalonato en las cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería genética que expresan genes de la ruta de mevalonato, hechas crecer en cultivo de alimentación discontinua a la escala de 15 l

(i) *Materiales*Fórmula del medio (por litro de medio de fermentación):

7,5 g de fosfato de potasio K₂HPO₄, 2 g de sulfato de magnesio MgSO₄*7H₂O, 2 g de ácido cítrico monohidratado C₆H₈O₇*H₂O, 0,34 g de citrato de amonio férrico NH₄FeC₆H₅O₇, 0,5 g de extracto de levadura (de Biospringer), 1,5 ml de disolución de metales traza 1000X modificada, 2,26 ml de ácido sulfúrico al 50 % p/v, 0,83 ml de Foam Blast 882 (Emerald Performance Materiales), 3,36 ml de disolución de macrosales. Se añadieron todos los componentes conjuntamente y se disolvieron en H₂O desionizada. Se esterilizó por calor esta disolución (123 °C durante 20 minutos). Después de enfriar hasta temperatura de ejecución, se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de amonio (28 %) y cantidad suficiente para enrasar. Se añadieron 16,7 g de disolución de alimentación n.º 1, 11,9 ml de disolución de vitaminas, y 5 ml disolución de espectinomicina, después de la esterilización y el ajuste del pH.

Disolución de metales traza 1000X modificada (por litro):

40 g de ácidos cítricos*H₂O, 30 g de MnSO₄*H₂O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO₄*7H₂O, 1 g de CoCl₂*6H₂O, 1 g de ZnSO₄*7H₂O, 100 mg de CuSO₄*5H₂O, 100 mg de H₃BO₃, 100 mg de NaMoO₄*2H₂O. Se disolvió cada componente de uno en uno en H₂O desionizada, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió una cantidad de la disolución suficiente para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de macrosales (por litro):

296 g de MgSO₄*7H₂O, 296 g de ácido cítrico monohidratado, 49,6 g de citrato de amonio férrico. Se disolvieron todos los componentes en agua, se añadieron en cantidad suficiente para enrasar y se esterizaron por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de vitaminas (por litro):

45 1,0 g de clorhidrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de clorhidrato de piridoxina. Se disolvió cada componente de uno en uno en H₂O desionizada, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió una cantidad de la disolución suficiente para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de espectinomicina (por litro):

Se añadieron 50 g de espectinomicina suficientes para enrasar con agua desionizada y se esterizaron por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de alimentación n.º 1 (por kilogramo):

0,590 kg de glucosa, 0,394 kg de H₂O desionizada, 7,4 g de K₂HPO₄ y 8,94 g de Foam blast 882. Se mezclaron todos los componentes conjuntamente y se sometieron a autoclave.

(ii) *Métodos experimentales*

Se realizó la fermentación en un biorreactor de 15 l con las cepas de *E. coli* BL21 descritas en la tabla 8. Cada cepa se sometió a ensayo dos veces, en condiciones idénticas, de modo que los resultados de productividad pudieran notificarse como un promedio de los dos resultados.

65

Tabla 8: Lista de cepas que producen mevalonato examinadas en cultivo semicontinuo a escala de 15 l

CMP680	HMB GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta</i> ldhA attB::Cm, pCLPtrcUpper(rbs) (pCHL276))
MCM1373	HMB GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta</i> ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Ef
MCM1374	HMB GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta</i> ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Ec
MCM1375	HMB GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta</i> ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Listeria
MCM1376	HMB GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta</i> ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Efaecium
MCM1377	HMB GI 1.2 gltA ML <i>ackA-pta</i> ldhA attB::Cm + pCL-Ptrc-Upper_Eg

Se descongeló un vial congelado de la cepa de *E. coli* y se inoculó en medio de extracto de levadura-triptona (medio Miller LB) en un matraz Erlenmeyer de 2,8 l que va a usarse como los inóculos para el biorreactor. Después de que el inóculo creciera hasta una densidad óptica de 1,0, medida a 550 nm (DO_{550}), se usaron 500 ml para inocular un biorreactor de 15 l y llevar el volumen inicial del tanque hasta 5 l.

Se llevó a cabo este experimento para monitorizar la formación de mevalonato a partir de glucosa al pH de 7,0 y la temperatura de 34 °C de fermentación deseados. Se mantuvieron las condiciones aerobias durante la duración de la ejecución burbujeando aire a una velocidad de 8 litros convencionales por minuto, manteniendo una presión de retorno de 0,7 bar de calibre, y una velocidad de agitación de 850 rotaciones por minuto, con impulsores y deflectores para transferir la potencia al medio líquido.

Se alimentó la disolución de alimentación de glucosa usando un programa de alimentación por pulsos. Tan pronto como se agotó la glucosa de lote, se señaló mediante una elevación de pH ($pH \geq 7,05$), se añadió un pulso de 3 g/min durante 20 min. Después de eso, se indujo un pulso de alimentación de glucosa mediante un disparador de pH ($pH \geq 7,05$). El pulso duró 30 min y la magnitud (g/min) fue igual a la velocidad de evolución de dióxido de carbono total (mmol/h) dividida entre un factor predeterminado suficiente para mantener la glucosa residual en el caldo en exceso. La cantidad total de glucosa administrada por alimentación al biorreactor durante la fermentación de 52 h varió entre cepas. Se logró inducción añadiendo isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se añadió una inyección de IPTG al tanque para llevar la concentración a 400 μ M cuando las células se encontraban a una DO_{550} de 4. Se determinaron los niveles de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono en el gas de escape de los biorreactores usando un espectrómetro de masas de Hiden. Se tomó un transcurso de tiempo de muestras de caldo a intervalos de 4 h de cada biorreactor. Se determinó la concentración en caldo de glucosa, citrato y mevalonato mediante HPLC. Se determinó la densidad óptica midiendo la absorbancia de las suspensiones de caldo diluidas a 550 nm y multiplicando por el factor de dilución, para notificar el resultado (DO_{550}). La lectura de DO_{550} se convirtió en masa celular seca usando factores generados previamente que comparan la DO_{550} con el peso celular seco durante el transcurso de tiempo de una fermentación. Se notifican los parámetros de productividad de rendimiento en masa, productividad específica, título e índice de productividad celular como un promedio de dos resultados en puntos de tiempo comparables de cada ejecución, usando las definiciones dadas anteriormente (véase "Definiciones").

(iii) Ensayo de rendimiento de mevalonato a pequeña escala

Se inocularon cultivos durante la noche en tubos de agitación que contenían 2 ml de caldo LB complementado con espectinomicina 50 μ g/ml (Novagen) y carbenicilina 50 μ g/ml (Novagen) de disoluciones madre congeladas. Entonces se incubaron los cultivos durante 14 h a 34 °C a 250 rpm. A continuación, se diluyeron los cultivos en una placa de 48 pocillos de 5 ml (Axygen Scientific) que contenía 2 ml de medio TM3 complementado con glucosa al 1 %, extracto de levadura hasta una concentración total del 1 %, e IPTG 200 μ M a una DO final de 0,2. Se selló la placa con una membrana Breath Easier (Diversified Biotech) y se incubó a 34 °C en un agitador/incubador Shel Lab a 600 rpm durante 24 horas. Se centrifugó 1 ml de cada cultivo a 3000 \times g durante 5 min. Se añadieron 250 μ l de sobrenadante a 19 μ l de ácido sulfúrico al 20 % y se incubaron sobre hielo durante 5 min. Entonces se centrifugó la mezcla durante 5 min a 3000 \times g y se recogió el sobrenadante para el análisis de HPLC. Se transfirieron 200 μ l de sobrenadante a una placa de polipropileno de fondo cónico de 96 pocillos compatible con HPLC (Nunc). Se determinó la concentración de mevalonato en las muestras mediante comparación con una curva patrón de mevalonato (Sigma). Se midió la concentración de glucosa realizando un ensayo de glucosa oxidasa según las especificaciones del fabricante (Pointe Scientific, Inc.).

(iv) Detección de mevalonato mediante HPLC:

Se realizó el análisis de HPLC en un sistema de HPLC 2695 de Waters Alliance que contenía un detector de índice de refracción Knauer K2301 usando una columna de exclusión iónica de BioRad - Aminex HPX-87H de 300 mm \times 7,8 mm (n.º de catálogo 125-0140) incubado a 50 °C y equipado con un recambio de BioRad Microguard Cation H de 30 mm \times 4,6 mm (n.º de catálogo 125-0129). Se ejecutaron las muestras a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min en tampón que contenía ácido sulfúrico 0,01 N. Los niveles de mevalonato en caldo pudieron cuantificarse comparando la respuesta de índice de refracción de cada muestra frente a una curva de calibración generada ejecutando diversas disoluciones que contienen mevalonato de concentración conocida.

La producción de mevalonato en cultivo discontinuo a rendimientos en masa a partir de glucosa osciló entre el

34,8 % y el 41,1 % de *E. coli* que contiene los genes *mvaE* y *mvaS* de los organismos *Listeria grayi*_DSM 20601, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* EG2, *Enterococcus casseliflavus* (figura 1, tabla 9).

5 Tabla 9: Rendimiento en masa de mevalonato a partir de glucosa. D.E. representa una desviación estándar de dos réplicas.

Cepa	IPTG (μM)	Rendimiento en masa (%)	D.E.
CMP680	100	33,6	0,8
MCM1373	100	31,8	0,8
MCM1374	100	35,8	3,9
MCM1375	100	34,6	0,2
MCM1376	100	35,6	3,2
MCM1377	100	41,0	0,1
CMP680	200	35,3	0,1
MCM1373	200	31,9	0,2
MCM1374	200	39,2	3,0
MCM1375	200	34,8	1,0
MCM1376	200	37,9	3,3
MCM1377	200	41,1	4,9

10 La producción de mevalonato en cultivo semicontinuo en un fermentador de 15 l a rendimientos en masa a partir de glucosa osciló de manera acumulativa entre el 39,1 % y el 43,4 % en *E. coli* que contiene los genes *mvaE* y *mvaS* de los organismos *Listeria grayi*_DSM 20601, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* EG2, *Enterococcus casseliflavus* (tabla 10).

15 Tabla 10: Resultados de rendimiento en masa acumulativo (promedio de los 3 puntos finales de las 2 ejecuciones para cada cepa)

Cepa	Enzimas superiores	Rendimiento en masa (Mevalonato sobre glucosa) (% p/p)	Desviación estándar (% p/p)	% C.V.
CMP680	<i>E. faecalis</i>	37,3	0,5	1,34 %
MCM1374	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	41,3	1,7	4,12 %
MCM1375	<i>Listeria grayi</i> DSM 20601	39,1	2,0	5,12 %
MCM1376	<i>Enterococcus faecium</i>	39,7	0,7	1,76 %
MCM1377	<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2	43,4	1,1	2,53 %

20 Las productividades específicas de los picos de mevalonato oscilaron entre 87,5 y 100,1 g/l/h/DO en cultivo semicontinuo en un fermentador de 15 l en *E. coli* que contiene los genes *mvaE* y *mvaS* de los organismos *Listeria grayi*_DSM 20601, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* EG2, *Enterococcus casseliflavus* (tabla 11).

Tabla 11: Productividad específica de los picos observada para cada cepa (promedio de los valores observados de los picos observados en las 2 ejecuciones para cada cepa)

Cepa	Enzimas superiores	Productividad específica de los picos (mg/l/h/DO)	Desviación estándar (mg/l/h/DO)	% C.V.
CMP680	<i>E. faecalis</i>	87,4	7,2	8,2 %
MCM1374	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	100,1	11,6	11,6 %
MCM1375	<i>Listeria grayi</i> DSM 20601	87,5	26,7	30,5 %
MCM1376	<i>Enterococcus faecium</i>	93,9	14,2	15,1 %
MCM1377	<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2	88,6	13,9	15,7 %

25 Finalmente, los títulos de mevalonato oscilaron entre 108,2 y 115,4 g/l (tabla 12), y los CPI oscilaron entre 4,86 y

5,80 g de mevalonato/g de glucosa (tabla 13) en *E. coli* que contiene los genes *mvaE* y *mvaS* de los organismos *Listeria grayi*_DSM 20601, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* EG2, *Enterococcus casseliflavus*.

5 Tabla 12: Título de mevalonato pico observado para cada cepa (promedio del título del caldo observado a las 48 h para cada conjunto de ejecuciones)

Cepa	Enzimas superiores	Título de mevalonato pico a las 48 h EFT (g/l)	Desviación estándar (g/l)	% C.V.
CMP680	<i>E. faecalis</i>	122,8	5,8	4,7 %
MCM1374	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	115,4	4,1	3,6 %
MCM1375	<i>Listeria grayi</i> DSM 20601	108,2	4,8	4,4 %
MCM1376	<i>Enterococcus faecium</i>	110,1	12,0	10,9 %
MCM1377	<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2	111,2	6,1	5,5 %

10 Tabla 13: Valores de CPI para cada cepa (promedio de los valores de CPI observados a las 44 y 48 horas para cada conjunto de ejecuciones)

Cepa	Enzimas superiores	CPI (g/g)	Desviación estándar (g/g)	% C.V.
CMP680	<i>E. faecalis</i>	4,25	0,25	5,9 %
MCM1374	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	5,70	0,37	6,5 %
MCM1375	<i>Listeria grayi</i> DSM 20601	4,86	0,73	15,0 %
MCM1376	<i>Enterococcus faecium</i>	5,29	0,12	2,3 %
MCM1377	<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2	5,80	0,52	8,9 %

Ejemplo 8: Construcción de las cepas que producen isopreno con mutaciones huésped

15 Puede introducirse una ruta de mevalonato inferior mediante transducción en CMP676 usando un lisado de MCM521 (véase la tabla 3). El marcador kanamicina se retira según el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania). La ruta inferior de MCM521 puede modificarse cambiando el promotor en el sentido de 5' del operón modificando el rbs delante de cada gen mediante el uso de genes alternativos. Los plásmidos pMCM1223 (*L. grayi*), pMCM1224 (*E. faecium*), pMCM1225 (*E. gallinarum*), pCHL276 (*E. faecalis*) o pCHL277 (*E. casseliflavus*) se someten a electroporación conjunta con una variación de plásmido pDW34 (véase la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º: 2010/0196977; figura 2). Los plásmidos, que son variantes de pDW34, contienen una variante isopreno sintasa, que se mejora para la actividad. Las colonias pueden seleccionarse sobre LB + espectinomina 50 ug/ml + carbenicilina 50 ug/ml.

25 La cepa resultante se modifica adicionalmente por ingeniería genética para modular la actividad de piruvato deshidrogenasa. Esta cepa puede modificarse adicionalmente por ingeniería genética para aumentar la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa. Esta cepa también puede modificarse adicionalmente por ingeniería genética para disminuir la actividad de la proteína represora piruvato descarboxilasa. Alternativamente, la cepa resultante también puede modificarse por ingeniería genética para modular la actividad de citrato sintasa. La actividad de citrato sintasa en la cepa resultante puede modularse disminuyendo la actividad de citrato sintasa. Alternativamente, la cepa resultante también puede modificarse por ingeniería genética para modular la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa. La actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa puede modularse disminuyendo la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa. Alternativamente, la cepa resultante también puede modificarse por ingeniería genética para modular la actividad de lactato deshidrogenasa. La actividad de lactato deshidrogenasa puede modularse disminuyendo la actividad de lactato deshidrogenasa. Alternativamente, la cepa resultante también puede modificarse por ingeniería genética para modular la actividad de enzima málica. La actividad de lactato deshidrogenasa puede modularse aumentando la actividad de enzima málica.

40 Ejemplo 9: Producción aumentada de isopreno en las cepas que contienen los plásmidos con mutaciones huésped en comparación con *E. faecalis* de tipo natural.

(i) *Materiales*

Fórmula de los medios TM3 (por litro de medios de fermentación):

5 13,6 g de K_2HPO_4 , 13,6 g de KH_2PO_4 , 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g ácido cítrico monohidratado, 0,3 g citrato de amonio férrico, 3,2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de extracto de levadura, 1 ml de disolución de metales traza 1000X. Se añaden todos los componentes conjuntamente y se disuelven en H_2O desionizada. Se ajusta el pH a 6,8 con hidróxido de amonio (30 %) y se enrasa. Los medios se esterilizan por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros. Se añaden 10,0 g de glucosa y antibióticos después de la esterilización y el ajuste del pH.

10 Disolución de metales traza 1000X (por litro de medios de fermentación)

15 40 g de ácido cítrico $\cdot H_2O$, 30 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3 , 100 mg de $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$. Se disuelve cada componente de uno en uno en H_2O desionizada. Se ajusta el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se enrasa la disolución y se esteriliza por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

(ii) *Procedimiento experimental*

20 Se hacen crecer células durante la noche en caldo Luria-Bertani + antibióticos. El día después, se diluyen hasta una DO_{600} de 0,05 en 20 ml de medio TM3 que contiene 50 ug/ml de espectinomycin y carbenicilina 50 ug/ml (en un matraz Erlenmeyer con deflector de 250 ml), y se incuban a 34 °C y 200 rpm. Después de 2 h de crecimiento, se mide la DO_{600} y se añade IPTG 200 uM. Se toman muestras de manera regular durante el transcurso de la fermentación. En cada punto de tiempo, se mide la DO_{600} . Además, se realiza análisis de gases de descarga de isopreno usando un ensayo de espacio de cabeza de cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (CG-EM) (Agilent). Se colocan cien microlitros de caldo completo en un vial de CG sellado y se incuban a 34 °C y 200 rpm durante un tiempo fijo de 30 minutos. Tras una etapa de destrucción por calor, que consiste en incubación a 70 °C durante 5 minutos, se carga la muestra en el CG. La productividad específica notificada es la cantidad de isopreno en ug/l leída mediante CG dividida entre el tiempo de incubación (30 min) y la DO_{600} medida.

30 (iii) *Resultados:*

Cuando las cepas que contienen una o más mutaciones en el huésped se comparan con el mismo fondo que contiene pCHL276 (*E. faecalis*), se observan productividad específica, rendimiento, CPI y/o título de isopreno aumentados.

35 Ejemplo 10: Construcción de las cepas productoras de amorfadieno o farneseno

40 Se introduce una ruta de mevalonato inferior mediante transducción en CMP676 usando un lisado de MCM521 (véase la tabla 3). Se retira el marcador de kanamicina según el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania). La ruta de MCM521 inferior puede modificarse cambiando el promotor en el sentido de 5' del operón modificando el rbs delante de cada gen mediante el uso de genes alternativos. Se sobreexpresa la difosfato de farnesilo sintasa (*ispA*), o bien alterando el promotor y/o rbs en el cromosoma, o bien expresándola a partir de un plásmido. Los plásmidos pMCM1223 (*L. grayi*), pMCM1224 (*E. faecium*), pMCM1225 (*E. gallinarum*), pCHL276 (*E. faecalis*) o pCHL277 (*E. casseliflavus*) se someten a electroporación conjunta con una variación del plásmido pDW34 (véase la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º: 2010/0196977; figura 2). Los plásmidos que son variantes de pDW34 contienen el codón de farneseno sintasa optimizado para *E. coli* o el codón de amorfadieno optimizado para *E. coli*, en vez de isopreno sintasa. Se seleccionan colonias sobre LB + espectinomycin 50 ug/ml + carbenicilina 50 ug/ml.

50 La cepa resultante se modifica además por ingeniería genética para modular la actividad de piruvato deshidrogenasa. Esta cepa puede modificarse además por ingeniería genética para aumentar la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa. Esta cepa también puede modificarse además por ingeniería genética para disminuir la actividad de la proteína represora de piruvato descarboxilasa. Alternativamente, la cepa resultante también puede modificarse por ingeniería genética para modular la actividad de citrato sintasa. La actividad de citrato sintasa en la cepa resultante puede modularse disminuyendo la actividad de citrato sintasa. Alternativamente, la cepa resultante también puede modificarse por ingeniería genética para modular la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa. La actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa puede modularse disminuyendo la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa. Alternativamente, la cepa resultante también puede modificarse por ingeniería genética para modular la actividad de lactato deshidrogenasa. La actividad de lactato deshidrogenasa puede modularse disminuyendo la actividad de lactato deshidrogenasa. Alternativamente, la cepa resultante también puede modificarse por ingeniería genética para modular la actividad de enzima málica. La actividad de lactato deshidrogenasa puede modularse aumentando la actividad de enzima málica.

65 Ejemplo 11: Producción aumentada de amorfadieno o farneseno en las cepas que contienen los plásmidos con mutaciones en el huésped en comparación con un *E. faecalis* de tipo natural.(i) *Materiales*

Fórmula de medios TM3 (por litro de medios de fermentación):

5 13,6 g de K_2HPO_4 , 13,6 g de KH_2PO_4 , 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 3,2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de extracto de levadura, 1 ml de disolución de metales traza 1000X. Se añaden todos los componentes conjuntamente y se disuelven en diH_2O . Se ajusta el pH a 6,8 con hidróxido de amonio (al 30 %) y se enrasa. Entonces se esterilizan por filtración los medios con un filtro de 0,22 micrómetros. Se añaden 10,0 g de glucosa y antibióticos después de la esterilización y el ajuste del pH.

10 Disolución de metales traza 1000X (por litro de medios de fermentación):

15 40 g de ácido cítrico $\cdot H_2O$, 30 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3 , 100 mg de $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$. Se disuelve cada componente de uno en uno en diH_2O . Se ajusta el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se enrasa la disolución y se esteriliza por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

(ii) *Procedimiento experimental*

20 Se hacen crecer células durante la noche en caldo de Luria-Bertani + antibióticos. El día después, se diluyen hasta una DO_{600} de 0,05 en 20 ml de medio TM3 que contiene 50 ug/ml de espectinomicina y carbenicilina 50 ug/ml (en un matraz Erlenmeyer con deflector de 250 ml), y se incuba a 34 °C y 200 rpm. Antes de la inoculación, se añade un recubrimiento de dodecano al 20 % (v/v) (Sigma-Aldrich) a cada matraz de cultivo para atrapar el producto de sesquiterpeno volátil tal como se describió previamente (Newman *et. al.*, 2006).

25 Después de 2 h de crecimiento, se mide la DO_{600} y se añade isopropil- β -d-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,05-0,40 mM. Se toman muestras regularmente durante el transcurso de la fermentación. En cada punto de tiempo, se mide la DO_{600} . Además, se somete a ensayo la concentración de amorfadieno o farneseno en la fase orgánica diluyendo el recubrimiento de dodecano en acetato de etilo. Se analizan los extractos de dodecano/acetato de etilo mediante métodos de CG-EM descritos previamente (Martin *et. al.*, Nat. Biotechnol. 2003, 21:96-802) monitorizando el ion molecular (m/z 204) y el ion del fragmento de m/z 189 para amorfadieno o el ion molecular (m/z 204) para farneseno. Se inyectan muestras de amorfadieno o farneseno de concentración conocida para producir curvas patrón para amorfadieno o farneseno, respectivamente. La cantidad de amorfadieno o farneseno en muestras se calcula usando las curvas patrón amorfadieno o farneseno, respectivamente.

35 (iii) *Resultados*

Cuando se comparan las cepas que contienen una o más mutaciones en el huésped con el mismo fondo que contiene pCHL276 (*E. faecalis*), se observan productividad específica, rendimiento, CPI y/o título de amorfadieno o farneseno aumentados.

40 (iv) *Bibliografía*

45 Newman, J.D., Marshal, J.L., Chang, M.C.Y., Nowroozi, F., Paradise, E.M., Pitera, D.J., Newman, K.L., Keasling, J.D., 2006. High-level production of amorphadiene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *E. coli*. Biotechnol. Bioeng. 95, 684-691.

Martin, V.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D., Keasling, J.D., 2003. Engineering a mevalonate pathway in *E. coli* for production of terpenoids. Nat. Biotechnol. 21, 796-802.

50 Ejemplo 12: Identificación de proteínas MvaE que no se degradan cuando se expresan en *E. coli* BL21 o *E. coli* BL21(DE3)

55 La degradación de proteína expresada de manera heteróloga en una célula puede dar como resultado pérdida de ATP debido al ciclo fútil de síntesis de proteínas y degradación de proteínas, disminución de la actividad catalítica de la proteína que se degrada, disminución de la concentración intracelular en estado estacionario de la proteína de interés, inducción de respuestas de estrés que pueden alterar la fisiología de la célula, y otros efectos que son potencialmente perjudiciales para la producción comercial de productos derivados de manera biológica (S.-O. Enfors, 2004). Por tanto, la expresión de proteínas de longitud completa que son menos propensas a degradarse es beneficiosa para la modificación por ingeniería metabólica. El producto del gen *mvaE* de *Enterococcus faecalis* se degrada parcialmente cuando se expresa en *E. coli* BL21 tal como se indica mediante fragmentos que pueden identificarse mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 3). También se identificaron fragmentos escindidos de *E. faecalis* MvaE mediante tinción con Safestain de material purificado con cola de His que se hizo correr por un gel de SDS-PAGE (figura 4). La identificación y el uso de productos del gen *mvaE* resistentes a la degradación son beneficiosos para la producción aumentada de mevalonato, isopreno e isoprenoides.

65 Se demostró que los productos génicos de los *mvaE* de los organismos *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, y

L. *grayi* no se degradan cuando se expresan en *E. coli* BL21 (DE3) tal como se indica mediante la ausencia de fragmentos que pueden identificarse en geles de SDS-PAGE teñidos con Safestain tras purificación mediada por cola de His o cuando se expresan en *E. coli* BL21 que produce mevalonato, isopreno o isoprenoides usando los métodos de detección descritos.

5

(i) *Métodos*

Se construyen plásmidos que contienen ADN que codifican MvaE con cola de His de *E. gallinarum*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* y *L. grayi*. Se expresa MvaE en *E. coli* BL21 (DE3) y se purifica mediante cromatografía en resina de Ni. Se analizan muestras purificadas mediante SDS-PAGE. Se purifican adicionalmente las muestras mediante cromatografía de intercambio aniónico y en algunos casos filtración en gel. Las muestras purificadas hasta una homogeneidad >95 % se envían para la producción de anticuerpos policlonales. Se analizan las cepas de producción mediante inmunotransferencia de tipo Western y se tratan con sonda usando los anticuerpos policlonales desarrollados contra la MvaE de interés.

15

(ii) *Bibliografía*

Enfors, S.O., Scheper, T. *Physiological Stress Responses in Bioprocesses*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004.

20 Ejemplo 13: Construcción de CMP451, (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA), CMP452 y CMP453

El promotor delante del gen de citrato sintasa (*gltA*) en BL21 (Novagen) se ha reemplazado por un promotor de baja expresión constitutivo, concretamente GI1.2 (patente estadounidense n.º 7.371.558). Se han descrito dos promotores de tipo natural para *gltA* (Wilde, R, y J. Guest. 1986. J. Gen. Microbiol. 132:3239-3251) y se insertó el promotor sintético justo después de la región a -35 del promotor distal. Se obtuvo un producto de PCR usando los cebadores UpgltACm-F (5'-TATTTAATTTTTAATCATCTAATTTGACAATCATTCAACAAAGTTGTTACAATTAACCCTCACTAAAGGGCGG-3') y DngltA1.xgiCm-R (5'-TCAACAGCTGTATCCCCGTTGAGGGTGAGTTTTGCTTTTGTATCAGCCATATATTCCA
CCAGCTATTTGTTAGTGAATAAAAAGTGGTTGAATTATTGCTCAGGATGTGGCATHG
TCAAGGGCTAATACGACTCACTATAGGGCTCG-3') y ADN molde de FRT-gb2-Cm-FRT de Gene Bridges (Heidelberg, Alemania) como molde. Se purificó el producto de PCR y se usó en una recombinación mediada por Lambda Red tal como describe el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania). Se seleccionaron varias colonias para caracterización adicional. Se amplificó por PCR la región promotora usando los cebadores gltAPromSeqF (5'-GGCAGTATAGGCTGTTACAAAATC-3') y gltAPromSeqR (5'-CTTGACCCAGCGTGCCCTTTCAGC-3') y, como molde, ADN extraído resuspendiendo una colonia en 30 ul de H₂O, calentando a 95 °C durante 4 min, centrifugando y usando 2 ul de ese material como molde en una reacción de 50 ul. Tras observar los resultados de secuenciación de los productos de PCR obtenidos, se guardó una colonia que albergaba cada uno de los tres promotores diferentes GI1.2, GI1.5 y GI1.6 (patente estadounidense 7.371.558) para uso adicional. Esas colonias se denominaron CMP141, CMP142 y CMP143, respectivamente (tabla 14).

40

Tabla 14: Cepas de *E. coli*

Cepa	Genotipo	Cepa parental	Fenotipo
CMP141	BL21 Cm-GI1.2 gltA	BL21	Expresión disminuida de citrato sintasa
CMP142	BL21 Cm-GI1.5 gltA	BL21	Expresión disminuida de citrato sintasa
CMP143	BL21 Cm-GI1.6 gltA	BL21	Expresión aumentada de citrato sintasa
CMP258	BL21 pgl+	BL21	Cepa BL21 restaurada para determinar la presencia de fosfogluconolactonasa
CMP374	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl ldhA::Kan	MD09-314	Delección de lactato deshidrogenasa
CMP440	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl Cm-GI1.2 gltA	MD09-314	Expresión disminuida de citrato sintasa
CMP441	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl Cm-GI1.5 gltA	MD09-314	Expresión disminuida de citrato sintasa
CMP442	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl Cm-GI1.6 gltA	MD09-314	Expresión aumentada de citrato sintasa
CMP451	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA	CMP440	Expresión disminuida de citrato sintasa
CMP452	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.5 gltA	CMP441	Expresión disminuida de citrato sintasa

ES 2 699 747 T3

CMP453	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.6 gltA	CMP442	Expresión aumentada de citrato sintasa
CMP596	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gltA ldhA::Kan	CMP451	Delección de lactato deshidrogenasa
CMP604	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA <i>ackA-pta</i> : Cm	CMP451	Delección de acetato cinasa y fosfotransacetilasa
CMP620	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA <i>ackA-pta</i> ::Cm ldhA::Kan	CMP604	Delección de acetato cinasa y fosfotransacetilasa y lactato deshidrogenasa
CMP635	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gltA <i>ackA-pta</i> ldhA	CMP620	Delección de acetato cinasa y fosfotransacetilasa y lactato deshidrogenasa
CMP646	BL21 attB::Cm	BL21 (Novagen)	Casete de cloranfenicol insertado en el cromosoma en la región de attTn7
CMP662	BL21 FRT-Cm-FRT-GI1.2 maeB	BL21 (Novagen)	Baja expresión constitutiva de enzima málica dependiente de NADPH
CMP671	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA Cm-GI1.2 maeB	CMP451	Baja expresión constitutiva de enzima málica dependiente de NADPH
CMP674	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA attB::Cm	CMP451	Ruta de citrato sintasa e inferior con regulación por disminución retirada del cromosoma
CMP676	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gltA <i>ackA-pta</i> ldhA attB:: Cm	CMP635	Ruta de citrato sintasa e inferior con regulación por disminución retirada del cromosoma y delección de acetato cinasa y fosfotransacetilasa y lactato deshidrogenasa
CMP678	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA attB::Cm, pCHL276	CMP674	Ruta de citrato sintasa e inferior con regulación por disminución retirada del cromosoma
CMP680	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2gltA <i>ackA-pta</i> ldhA attB::Cm, pCHL276	CMP676	Ruta de citrato sintasa, inferior con regulación por disminución retirada del cromosoma y delección de acetato cinasa y fosfotransacetilasa y lactato deshidrogenasa
CMP681	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA GI1.2 maeB	CMP671	Baja expresión constitutiva de enzima málica dependiente de NADPH
CMP694	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl, pCHL276	CMP258	Control. Sin mutaciones adicionales en el huésped.
CMP706	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA GI1.2 maeB attB::Cm	CMP681	Expresión disminuida de citrato sintasa, baja expresión constitutiva de enzima málica dependiente de NADPH, y ruta inferior retirada del cromosoma
CMP711	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA GI1.2 maeB attB::Cm, pCHL276	CMP706	ruta inferior retirada del cromosoma
CMP723	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2gltA <i>ackA-pta</i>	CMP604	Acetato cinasa y fosfotransacetilasa
CMP725	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl	MD10-435	Represor de piruvato

	G11.2-gltA pdhR attB::Cm		descarboxilasa delecionado, y ruta inferior retirada del cromosoma
CMP729	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2-gltA pdhR attB::Cm, pCHL276	CMP725	Represor de piruvato descarboxilasa delecionado, y ruta inferior retirada del cromosoma
CMP735	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2gltA <i>ackA-pta</i> attB::Cm	CMP723	Acetato cinasa y fosfotransacetilasa delecionadas, y ruta inferior retirada del cromosoma
CMP736	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2gltA <i>ackA-pta</i> attB::Cm, pCLPtrcUpper(rbs)	CMP735	Acetato cinasa y fosfotransacetilasa delecionadas, y ruta inferior retirada del cromosoma
CMP812	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2 gltA ldhA::Kan attB::Cm	CMP596	Lactato deshidrogenasa delecionada, y ruta inferior retirada del cromosoma
CMP828	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2 gltA ldhA attB	CMP812	Lactato deshidrogenasa delecionada y ruta inferior retirada del cromosoma
CMP832	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2 gltA ldhA attB, pCHL276	CMP828	Lactato deshidrogenasa delecionada y ruta inferior retirada del cromosoma
MCM521	BL21 neo-PL.2-mKKDyl	Sol. de patente estadounidense n.º: 12/978.324	Cepa BL21 que contiene una ruta de "mevalonato inferior"
MCM1002	BL21 pgl+, pMCM82, pTrcHis2B	CMP258	Cepa de control
MD09-273	BL21 pgl+ FRT::PL.6-rbsyIDI-aspA PL.2 mKKDyl	BL21	Cepa usada para recombinaría de fragmentos en el cromosoma
MD09-313	BL21 pgl+ neo-PL.2-mKKDyl	CMP258	Ruta de mevalonato inferior en el cromosoma, marcador de neomicina
MD09-314	BL21 pgl+ PL.2-mKKDyl	MD09-313	Ruta de mevalonato inferior en el cromosoma, sin marcador de antibiótico
MD10-429	BL21 wt+ pgl+ FRT::PL.6-rbs-yIDI-aspA PL.2 mKKDyl pdhR::Kan	MD09-273	Represor de piruvato descarboxilasa delecionado
MD10-432	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2-gltA pdhR: :Kan	CMP451	Represor de piruvato descarboxilasa delecionado
MD10-434	BL21 pgl+ PL.6-rbs-yIDlaspA PL.2 mKKDyl Cm:: PL.6-pdh	MD10-426	Promotor constitutivo fuerte en el sentido de 5' de enzimas estructurales piruvato descarboxilasas
MD10-435	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2-gltA pdhR	MD10-432	Represor de piruvato descarboxilasa delecionado
MD 10-440	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2-gltA Cm::PL.6-pdh	MD09-314	Promotor constitutivo fuerte en el sentido de 5' de enzimas estructurales piruvato descarboxilasas
MD 10-446	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2-gltA PL.6-pdh	MD09-314	Promotor constitutivo fuerte en el sentido de 5' de enzimas estructurales piruvato descarboxilasas
MD10-551	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2-gltA ⁺ PL.6-pdh attB::Cm	MD 10-446	Represor de piruvato descarboxilasa delecionado

MD10-554	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2-gltA+ PL.6-pdh attB	MD10-551	Promotor constitutivo fuerte en el sentido de 5' de enzimas estructurales piruvato descarboxilasas, y ruta inferior retirada del cromosoma
MD10-555	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2-gltA ⁺ PL.6-pdh attB, pCHL276	MD10-554	Promotor constitutivo fuerte en el sentido de 5' de enzimas estructurales piruvato descarboxilasas, y ruta inferior retirada del cromosoma
MD491	BL21 pgl+ <i>ackA-pta</i> ::Cm	CMP258	Delección de acetato cinasa y fosfotransacetilasa

Se construyó la cepa MD09-313 mediante la transducción de CMP258 (véase la solicitud de patente estadounidense n.º: 12/978.324) con un lisado de P1 de cepa MCM521 (véase la solicitud de patente estadounidense n.º: 12/978.324) y la selección de colonias sobre placas de Luria-Bertani que contenían kanamicina 20 ug/ml. Se prepararon lisados de P1 según el método descrito en Ausubel, *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. Se retiró el marcador de kanamicina usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar la cepa MD09-314.

Se produjeron lisados de P1 a partir de las cepas CMP141, CMP142 y CMP143 y se usaron para transducir la cepa MD09-314, para formar CMP440, CMP441 y CMP442, respectivamente (tabla 3). Se retiró el marcador cloranfenicol usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar las cepas CMP451, CMP452 y CMP453, respectivamente (tabla 14).

Ejemplo 14: Ensayo de citrato sintasa y resultados

Se midió la actividad de citrato sintasa (gltA) mediante un método similar al descrito en Sudgen, P. y Newsholm, E. 1975. Biochem. J. 150:105-111. En resumen, mide a 412 nm la liberación de CoASH a partir de acetil-CoA mediante reacción con DTNB.

Se hicieron crecer las cepas MD09-313, CMP451, CMP452 y CMP453 durante la noche en 5 ml de LB, a 34 °C y 200 rpm. Se diluyeron hasta una DO₆₀₀ de 0,05 en 20 ml de medio TM3 (descrito previamente en la patente estadounidense n.º 7.745.184, col. 32, líneas 46-61) que contenía glucosa 10 g/l. Se hicieron crecer las células a 34 °C y 200 rpm hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 2-3. Se centrifugó el caldo, y se congeló el sedimento así obtenido a -80 °C. El día del ensayo, se resuspendió el sedimento en un tampón de ensayo y se rompieron las células usando una celda de presión francesa. Se usó el lisado así obtenido en el ensayo de citrato sintasa.

Se muestran los resultados del ensayo en la figura 6. Las cepas 451 y 452 tenían aproximadamente la mitad de la actividad de la de tipo natural, mientras que la cepa CMP453 tenía aproximadamente 1,5x la actividad de la de tipo natural.

Ejemplo 15: Construcción de la cepa MCM1002

El plásmido pMCM82 (pCLPtrUpper) se sometió a electroporación conjunta en la cepa CMP258 y se seleccionaron colonias sobre LB + espectinomicina 50 ug/ml. Se recogió una colonia y se sometió a electroporación con pTcHis2B (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se seleccionaron los transformantes sobre LB + espectinomicina 50 ug/ml y carbenicilina 50 ug/ml. Se recogió una colonia y se nombró como MCM1002.

Ejemplo 16: Construcción de las cepas CMP604 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDvl GI1.2 gltA *ackA-pta*::Cm), CMP723 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDvl GI1.2slitA *ackA-pta*) y CMP735 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2slitA *ackA-pta* attB::Cm)

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contenía los genes *ackA-pta* interrumpidos por un marcador cloranfenicol usando la cepa Triple Triple en la que el marcador cloranfenicol está todavía en (US7.745.184 B2) como molde y los cebadores *ackACF* (5'-GTGCAAATTCACAACCTCAGCGG-3') y *ptaCR* (5'-CACCAACGTATCGGGCAT TGCC-3'). Se usó el producto de PCR obtenido en una reacción de recombinación tal como recomienda el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para integrar el producto de PCR en el locus de *ackA-pta* en la cepa CMP258 (véase la solicitud de patente estadounidense n.º: 12/978.324). Se seleccionaron colonias sobre LB + 5 ug/ml de cloranfenicol. Se recogió una colonia y se nombró como MD491. Se preparó un lisado de P1 de MD491 y se usó para transducir la cepa CMP451. Se seleccionaron colonias sobre LB + 5 ug/ml de cloranfenicol. Se recogió una colonia y se nombró como CMP604. Se retiró el marcador cloranfenicol usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar la cepa CMP723. CMP723 se transdujo con un lisado de P1 producido a partir de la cepa CMP646 (véase el ejemplo 18). Se

seleccionaron colonias en placas que contiene LB + cloranfenicol 5 ug/ml. Se recogió una colonia y se nombró como CMP735.

Ejemplo 17: Construcción de las cepas CMP596 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gItA ldhA::Kan), CMP812 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gItA ldhA::Kan attB::Cm) y CMP828 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gItA ldhA attB)

La cepa CMP451 se transdujo con un lisado de P1 producido basándose en la cepa CMP374 (véase a continuación) que contenía un marcador kanamicina en el gen de lactato deshidrogenasa (ldhA). Se sembraron en placa las colonias sobre LB + 20 ug/ml kanamicina. Se eligió una colonia y se nombró como CMP596. CMP596 se transdujo con el lisado de P1 producido a partir de la cepa CMP646 (véase el ejemplo 18). Se seleccionaron transductantes sobre LB + cloranfenicol 5 ug/ml. Se seleccionó una colonia y se nombró como CMP812. Se retiraron los marcadores kanamicina y cloranfenicol en una etapa usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar la cepa CMP828.

Ejemplo 18: Construcción de las cepas CMP620 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gItA ackA-pta::Cm ldhA::Kan) y CMP635 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gItA ackA-pta ldhA)

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contenía el gen *ldhA* interrumpido por un marcador kanamicina usando la cepa JW 1375 de la colección Keio (Baba *et al.* 2006. Mol. Syst. Biol. 2: 2006.0008) como molde, y los cebadores *ldhA*seqR (5'-GGCTTACCGTTTACGCTTCCAGC-3') y *ldhA*seqF2 (5'-CTAATGCAATACGTGTCCCGAGC-3'). Se usó el producto de PCR obtenido en una reacción de recombinería tal como recomienda el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para integrar el producto de PCR en el locus de *ldhA* en la cepa MD09-313. Se seleccionaron colonias sobre LB + 20 ug/ml de kanamicina. Se recogió una colonia y se nombró como CMP374. Se produjo un lisado de P1 de CMP374 y se usó para transducir CMP604. Se seleccionaron colonias sobre LB + 20 ug/ml de kanamicina. Se recogió una colonia y se nombró como CMP620. Se retiraron simultáneamente los marcadores cloranfenicol y kanamicina mediante electroporación de pCP20 (Datsenko y Wanner. 2000. PNAS 97:6640-5) en la cepa, selección de dos colonias sobre LB + carbenicilina 50 ug/ml a 30 °C, y luego nueva siembra en estrías de esas colonias sobre una placa de LB a 42 °C. Se seleccionó una colonia sensible a cloranfenicol y kanamicina de esas placas y se nombró como CMP635.

Ejemplo 19: Construcción de las cepas CMP674 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDvl GI1.2 gItA attB::Cm) y CMP676 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gItA ackA-pta ldhA attB::Cm)

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contenía un marcador cloranfenicol flanqueado por ADN homólogo a las regiones en 5' y en 3' del sitio de unión a λ , attB usando el plásmido pKD3 (Datsenko, K., y Wanner, B. 2000. PNAS 97:6640-6645) como molde, y los cebadores CMP171 (5'-AAAATTTTCATTCTGTGACAGAGAAAAAGTAGCCGAAGATGACGGTTTGTACATG GAGTTGGCAGGATGTTTGATTACATGGGAATTAGCCATGGTCC-3') y CMP172 (5'-GACCAGCCGCGTAACCTGGCAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCT GCGTAAG CGG GGCATT TTTCTTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'). Se usó el producto de PCR obtenido en una reacción de recombinería en BL21 (Novagen) tal como recomienda el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para integrar el producto de PCR en el sitio de unión a λ , attB. Se generó de ese modo la cepa CMP646, se seleccionó sobre LB + cloranfenicol 5 ug/ml. Se produjo un lisado de P1 de CMP646 y se usó en una reacción de transducción con las cepas CMP451 y CMP635, retirando de ese modo la ruta de mevalonato inferior (mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, difosfomevalonato descarboxilasa y difosfato de isopentenilo isomerasa) del cromosoma de esa cepa. Se sembró en placa la reacción de transducción sobre LB + cloranfenicol 5 ug/ml y se escogió una colonia para cada transducción y se nombraron como CMP674 y CMP676, respectivamente.

Ejemplo 20: Construcción de las cepas CMP678 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gItA, pCHL276), CMP680 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gItA ackA-pta ldhA attB::Cm), CMP694 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl, pCHL276), CMP736 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gItA ackA-pta attB::Cm, pCHL276) y CMP832 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDvl GI1.2 gItA ldhA attB, pCHL276)

Se introdujo el plásmido pCHL276 en las cepas CMP674, CMP676, CMP258, CMP735 y CMP828 mediante electroporación. Se seleccionaron colonias sobre LB + espectinomycinina 50 ug/ml. Se escogió una colonia para cada transformación y se nombraron como CMP678, CMP680, CMP694, CMP736 y CMP832, respectivamente.

Ejemplo 21: Producción aumentada de mevalonato en una cepa que contiene el constructo GI1.2gItA en comparación con su cepa parental, y una producción aumentada de mevalonato en una cepa que contiene *ackA-pta* ldhA en comparación con su cepa parental o una cepa que contiene una mutación cada vez.

Este ejemplo muestra la producción de mevalonato en las cepas CMP678, CMP680, CMP694, CMP736 y CMP832.

(i) *Materiales*

Fórmula de medios TM3 (por litro de medios de fermentación):

13,6 g de K₂HPO₄, 13,6 g de KH₂PO₄, 2 g de MgSO₄*7H₂O, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 3,2 g de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g de extracto de levadura, 1 ml de disolución de metales traza 1000X. Se añadieron todos los componentes conjuntamente y se disolvieron en diH₂O. Se ajustó el pH a 6,8 con hidróxido de amonio (al 30 %) y se enrasó. Se esterilizaron por filtración los medios con un filtro de 0,22 micrómetros. Se añadieron 10,0 g de glucosa y antibiótico después de la esterilización y el ajuste del pH.

Disolución de metales traza 1000X (por litro de medios de fermentación):

40 g de ácido cítrico*H₂O, 30 g de MnSO₄*H₂O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO₄*7H₂O, 1 g de CoCl₂*6H₂O, 1 g de ZnSO₄*7H₂O, 100 mg de CuSO₄*5H₂O, 100 mg de H₃BO₃, 100 mg de NaMoO₄*2H₂O. Se disuelve cada componente de uno en uno en diH₂O. Se ajusta el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se enrasa la disolución y se esteriliza por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

15 (ii) *Procedimiento experimental*

Se hicieron crecer células durante la noche en caldo de Luria-Bertani. El día después, se diluyeron hasta una DO₆₀₀ de 0,05 en 20 ml de medio TM3 que contiene 50 ug/ml de espectinomicina (en un matraz Erlenmeyer con deflector de 250 ml), y se incubó a 34 °C y 200 rpm. Después de 2 h de crecimiento, se midió la DO₆₀₀ y se añadió IPTG 100 uM. Se tomaron muestras regularmente durante el transcurso de la fermentación. En cada punto de tiempo, se midió la DO₆₀₀ y se midió la concentración de mevalonato mediante HPLC. Se realizó el análisis de HPLC del siguiente modo: se añadieron 15 ul de ácido perclórico al 70 % (p/v) a 500 ul de caldo y se incubó la mezcla en hielo durante 5 minutos. A continuación, se centrifugó la muestra a 14 000xg durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante para el análisis de HPLC ejecutado en las siguientes condiciones: (1) columna de exclusión iónica de BioRad - Aminex HPX-87H de 300 mm × 7,8 mm) (n.º de catálogo 125-0140) (BioRad, Hercules, California); (2) temperatura de columna = 50 °C; (3) un recambio de precolumna de BioRad - Microguard Cation H (30 mm × 4,6 mm) (n.º de catálogo 125-0129) (BioRad); (4) tampón de ejecución = H₂SO₄ 0,01 N; (5) velocidad de flujo de tampón de ejecución = 0,6 ml/min; (6) presión de ejecución aproximada = ~950 psi; (7) volumen de inyección = 100 microlitros; (8) tiempo de ejecución = 26 minutos.

30 (iii) *Resultados*

Se evaluó la cepa CMP678 (GI1.2gltA) usando la cepa CMP694 (parental) como control.

35 El experimento demostró que la cepa CMP678, que tiene el promotor de *gltA* regulado por disminución, mostró un título aumentado a partir de la misma cantidad de glucosa cuando se comparó con una cepa con un promotor de tipo natural para *gltA* (CMP694) (figura 8). Las cepas con un promotor de *gltA* regulado por disminución crecieron hasta una DO ligeramente menor que la de la cepa con un promotor WT (figura 7).

40 Se evaluaron las cepas CMP680 (*ackA-pta ldhA*), CMP736 (*ackA-pta*) y CMP832 (*ldhA*) usando la cepa CMP678 (parental) como control. La mutación de *ackA-pta* contribuyó a un crecimiento más lento y una menor DO final para la cepa, mientras que la mutación de *ldhA* no afectó al crecimiento (figura 7). La combinación de las mutaciones de *ackA-pta* y *ldhA* ralentizó el crecimiento y disminuyó la biomasa final adicionalmente (figura 7) más. Por sí mismas, las mutaciones de *ackA-pta* o *ldhA* no contribuyeron a una mayor concentración final de mevalonato, pero en combinación, proporcionaron un aumento del título del 250 % (y el rendimiento puesto que está relacionado con el título a pequeña escala) (figura 8).

Ejemplo 22: Construcción de CMP662 (BL21 FRT-Cm-FRT-GI1.2 maeB)

50 El promotor nativo delante de la enzima málica dependiente de NADP (*maeB*) se ha reemplazado por un promotor constitutivo, concretamente GI1.2 (patente estadounidense n.º 7.371.558). El sitio de inserción del nuevo promotor se ha elegido cuidadosamente para no alterar la expresión del gen justo en el sentido de 5' (*talA*) que se traduce en el sentido opuesto (figura 9). Aunque no se ha descrito el promotor de *maeB*, se ha determinado experimentalmente el promotor de *talA* (Lacour & Landini, 2004, J. Bact. 186:7186-7195).

55 Se ha obtenido un producto de PCR usando los cebadores maeB_GI1.xpKD3 (5'-ACT GGA AAT TCA TGG AAA TCA AGT GCA CTT TGT TTT AAC TGG TCA TCC ATT ATA TAC CTC CTG CTA TTT GTT AGT GAA TAA AAG TGG TTG AAT TAT TTG CTC AGG ATG TGG CAT n GT CAA GGG CGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC-3') y maeBUp_pKD3 (5'-AGA GTT TGG ACT TGC TCA AAG TCT GTA GAC TCC GGC AGG GTA ATA ATG TGC GCC ACG TTG TGG GCA GGG G ATGGGAATTAGCCATGGTCC-3') y el plásmido pKD3 (Datsenko & Wanner 2000, PNAS 97:6640-6645) como molde. La enzima Herculase II (Agilent, Santa Clara, US) se usó según el fabricante. Se purificó el producto de PCR y se usó en una recombinación mediada por Lambda Red tal como describe el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania). Se seleccionaron varias colonias para caracterización adicional. Se amplificó por PCR la región promotora usando los cebadores maeBPromSeqF: GTGAACGTGTTTGATGCCGTC y maeBPromSeqR: ccgtaccgtagagatcacc y, como molde, ADN extraído resuspendiendo una colonia en 30 ul de H₂O, calentando a 95 °C durante 4 min, centrifugando y usando 2 ul de ese material como molde en una reacción de

50 ul. Tras observar los resultados de secuenciación de los productos de PCR obtenidos, se guardó una colonia que albergaba el promotor GI1.2 (patente estadounidense 7.371.558) para uso adicional. Esta colonia se nombró como CMP662 (tabla 3). Se produjo un lisado de P1 de cepa CMP662 y se usó para transducir CMP451. Se seleccionaron colonias sobre LB + 5 ug/ml de cloranfenicol. Se recogió una colonia y se nombró como MDCMP671. Se retiró el marcador cloranfenicol usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar la cepa CMP68. CMP681 se transdujo con un lisado de P1 producido a partir de la cepa CMP646 (véase el ejemplo 18). Se seleccionaron colonias en placas que contienen LB + cloranfenicol 5 ug/ml. Se recogió una colonia y se nombró como CMP706.

10 Ejemplo 23: Construcción de las cepas MD10-432(BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2-gltA pdhR::Kan), MD10-435 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2-gltA pdhR) y CMP725 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2-gltA pdhR attB::Cm) – línea celular mutante pdhR

15 Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contenía el gen *pdhR* interrumpidos por un marcador kanamicina usando la cepa JW0109 de la colección Keio (Baba *et al.* 2006 Mol. Syst. Biol. 2:2006.0008) usando los cebadores MQ10-82F (5'-GGTAAGTGAATCGGTTCAATTCGG-3') y MQ10-82R (5'-CGCTCAACACCTTCTTCACGGATG-3'). Se purificó el producto de PCR obtenido con el kit de purificación de PCR Qiagen (Qiagen, Germantown, MD) y se usó en una reacción de recombinación tal como recomienda el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para integrar el producto de PCR en el locus de *pdhR* en la cepa MD09-273. Se seleccionaron los transformantes sobre placas con LA + Kan 12,5 ug/ml incubadas a 37 °C. Se recogió una colonia y se verificó mediante PCR usando los cebadores MQ10-83F (5'-CCTGTATGGACATAAGGTGAATAC-3') y MQ10-83R (5'-CCTGTCCCATTGAACTCTCGCCGG-3') que estaban aproximadamente a ~250 pb en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de la región del gen de *pdhR*. El mutante correcto se nombró como MD 10-429.

25 Se produjo un lisado de P1 de cepa MD 10-429 y se usó para transducir CMP451. Se seleccionaron colonias en LB + Kan 12,5 mg/ml. Se examinaron varias colonias transductantes mediante PCR usando los cebadores exteriores MQ10-83F (5'-CCTGTATGGACATAAGGTGAATAC-3') y MQ10-83R (5'-CCTGTCCCATTGAACTCTCGCCGG-3'). El mutante correcto en la cepa de fondo CMP451 se nombra como MD10-432.

30 Se retiró el marcador de kanamicina mediante recombinación *dd FRT* mediante electroporación de pCP20 (Datsenko y Wanner, 2000, PNAS 97:6640-5), selección de un par de colonias sobre LA + carbenicilina 50 ug/ml a 30 °C, y luego nueva siembra de la colonia de interés sobre una placa de LA a 37 °C. La cepa sin marcador resultante se nombró como MD10-435. La cepa MD10-435 se transdujo con el lisado de P1 producido a partir de la cepa CMP646 (véase el ejemplo 18). Se seleccionaron transductantes sobre LB + cloranfenicol 5 ug/ml. Se seleccionó una colonia y se nombró como CMP725.

35 Ejemplo 24 : Construcción de las cepas MD10-434 (BL21 pgl+ PL.6-rbs-yIDl-aspA PL.2 mKKDyl + Cm::PL.6-pdh), MD10-440 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2-gltA⁺ Cm::PL.6-pdh) y MD10-446 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2-gltA⁺ PL.6-pdh)- línea celular mutante PL.6-pdh

40 El promotor delante del operón Pdh (complejo de piruvato deshidrogenasa) en BL21 (Novagen) se ha modificado reemplazando el promotor nativo por un promotor de alta expresión constitutivo, concretamente PL.6. Se obtuvo un producto de PCR usando los cebadores MQ10-84F (5'-AGAGTTCAATGGGACAGGTTCCAGAAAACCAACGTTATTAGATAGATAAGGAATA
45 ACCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3') y MQ10-84R (5'-CGTCATTTGGGAAACGTTCTGACATGTTTTTTTACCTCCTTGCACCTTCATGGTGGT
CAGTGCCTCCTGCTGATGTGCTCAGTATCACCGCCAGTGGTATTTATGTCAACACCG
CCAGAGATAATTTATCACCGCAGATGGTTATCTGTATGTTTTTATATGAATTCATAT GAATATCCTCCTTA-3') para amplificar el gen de cloranfenicol flanqueado por sitios de *FRT* del plásmido pKD3 (Datsenko y Wanner. 2000, PNAS 97:6640-5). Se generó un segundo producto de PCR usando BL21 como molde para amplificar la totalidad del operón PDH (*aceE*, *aceF* e *lpdA*) usando los cebadores MQ10-85F (5'-ATGTCAGAACGTTTCCCAAATGACG-3') y MQ10-85R (5'-GCGGCGTGGTTAGCCGCTTTTTTAATTGCCGGATGTTCCGGCAAACGAAAATTACT
50 TCTTCTTCGCTTTCGGGTTTC-3'). Se usó PCR de fusión para fusionar ambos trozos de ADN conjuntamente, con los cebadores MQ10-84F y MQ10-85R. Se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 1,6 Kpb y se purificó usando un kit de purificación de PCR Qiagen (Qiagen, Germantown, MD). Se usaron aproximadamente, 300-400 ng de producto de PCR purificado en una recombinación mediada por Lambda Red tal como describe el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) que se dirige al promotor PDH en la cepa MD09-273. Cuando esta integración no pudo integrarlo, se volvió a amplificar el producto de PCR usando una versión más corta de cebador inverso (MQ10-91R 5'-GAAGTGGTTAAAGCACAC-3'). Como resultado, se integró satisfactoriamente un producto de PCR
60 de ~1,6 kpb en MD09-273. Se seleccionaron los transformantes sobre LA+ cloranfenicol 5 ug/ml. Se seleccionaron varias colonias para caracterización adicional usando los cebadores MQ10-84F y MQ10-84R. Se amplificó por PCR la región promotora usando otros cebadores MQ10-84F y MQ10-91R para verificación adicional. Se secuenció el producto de PCR obtenido y se mostró que era correcto, y la cepa se nombró como MD10-434.

65 Se produjo un lisado de P1 de MD10-434 y se usó para transducir CMP451. Se seleccionaron transductantes sobre LB+ cloranfenicol 5 mg/ml. Se verificaron varias colonias mediante PCR usando los cebadores MQ10-84F y MQ10-

84R. Se escogió un mutante y se nombró como MD10-440.

Se retiró el marcador cloranfenicol mediante recombinación de FRT (Datsenko & Wanner. 2000. PNAS 97:6640-5), usando el plásmido pCP20. Una vez que se obtuvieron los transformantes sobre LA+ carbenicilina 50 ug/ml a 30 °C, volvieron a sembrarse en estrías dos colonias sobre una placa de LB y se incubaron a 37 °C. Se seleccionó una colonia sensible a cloranfenicol de esas placas y se nombró como MD 10-446.

MD10-446 se transdujo con un lisado de P1 obtenido a partir de la cepa CMP646 (véase el ejemplo 18). Se seleccionaron transductantes sobre LB + cloranfenicol 5 ug/ml. Se seleccionó una colonia y se nombró como MD10-551. Se retiró el marcador cloranfenicol mediante recombinación de FRT (Datsenko & Wanner. 2000. PNAS 97:6640-5), usando el plásmido pCP20. Una vez que se obtuvieron los transformantes sobre LA+ carbenicilina 50 ug/ml a 30 °C, volvieron a sembrarse en estrías dos colonias sobre una placa de LB y se incubaron a 37 °C. Se seleccionó una colonia sensible a cloranfenicol de esas placas y se nombró como MD10-554.

Ejemplo 25: Construcción de las cepas MD10-555 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI 1.2 gltA PL.6pdh attB::Cm, pCHL276), CMP711 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2 gltA GI1.2 maeB attB::Cm, pCHL276), CMP729 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl GI1.2-gltA pdhR attB::Cm, pCHL276)

Se introdujo el plásmido pCHL276 (véase el ejemplo 6 (iii)) en las cepas MD10-446, CMP706 y CMP725 mediante electroporación. Se seleccionaron colonias sobre LB + espectinomicina 50 ug/ml. Se escogió una colonia para cada transformación y se nombraron como MD10-555, CMP711 y CMP729, respectivamente.

Ejemplo 26: Producción aumentada de mevalonato en las cepas que contienen las mutaciones de GI1.2maeB, pdhR y PL.6 pdh en comparación con su cepa parental

Este ejemplo muestra la producción de mevalonato en las cepas CMP678, MD10-555, CMP711 y CMP729.

(i) *Materiales*

Fórmula de medios TM3 (por litro de medios de fermentación):

13,6 g de K₂HPO₄, 13,6 g de KH₂PO₄, 2 g de MgSO₄*7H₂O, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 3,2 g de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g de extracto de levadura, 1 ml de disolución de metales traza 1000X. Se añadieron todos los componentes conjuntamente y se disolvieron en diH₂O. Se ajustó el pH a 6,8 con hidróxido de amonio (al 30 %) y se enrasó. Se esterilizaron por filtración los medios con un filtro de 0,22 micrómetros. Se añadieron 10,0 g de glucosa y antibiótico después de la esterilización y el ajuste del pH.

Disolución de metales traza 1000X (por litro de medios de fermentación):

40 g de ácido cítrico*H₂O, 30 g de MnSO₄*H₂O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO₄*7H₂O, 1 g de CoCl₂*6H₂O, 1 g de ZnSO₄*7H₂O, 100 mg de CuSO₄*5H₂O, 100 mg de H₃BO₃, 100 mg de NaMoO₄*2H₂O. Se disuelve cada componente de uno en uno en diH₂O. Se ajusta el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se enrasa la disolución y se esteriliza por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

(ii) *Procedimiento experimental*

Se hicieron crecer células durante la noche en caldo de Luria-Bertani. El día después, se diluyeron hasta una DO₆₀₀ de 0,05 en 20 ml de medio TM3 que contiene 50 ug/ml de espectinomicina (en un matraz Erlenmeyer con deflector de 250 ml), y se incubó a 34 °C y 200 rpm. Después de 2 h de crecimiento, se midió la DO₆₀₀ y se añadió IPTG 100 uM. Se tomaron muestras regularmente durante el transcurso de la fermentación. En cada punto de tiempo, se midió la DO₆₀₀ y se midió la concentración de mevalonato mediante HPLC. Se realizó el análisis de HPLC del siguiente modo: se añadieron 15 ul de ácido perclórico al 70 % (p/v) 500 ul de caldo y se incubó la mezcla en hielo durante 5 minutos. A continuación, se centrifugó la muestra a 14 000x g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante para el análisis de HPLC ejecutado en las siguientes condiciones: (1) columna de exclusión iónica de BioRad - Aminex HPX-87H de 300 mm x 7,8 mm (n.º de catálogo 125-0140) (BioRad, Hercules, California); (2) temperatura de columna = 50 °C; (3) un recambio de precolumna de BioRad - Microguard Cation H (30 mm x 4,6 mm) (n.º de catálogo 125-0129) (BioRad); (4) tampón de ejecución = H₂SO₄ 0,01 N; (5) velocidad de flujo de tampón de ejecución = 0,6 ml/min; (6) presión de ejecución aproximada = -950 psi; (7) volumen de inyección = 100 microlitros; (8) tiempo de ejecución = 26 minutos.

(iii) *Resultados*

Se evaluaron las cepas MD10-555 (PL.6pdh), CMP711 (GI1.2maeB) y CMP729 (pdhR) usando la cepa CMP678 (parental) como control.

El experimento demostró que la cepa MD10-555 y CMP729, presumiblemente fluyendo más piruvato hacia acetil-

CoA, y CMP711, devolviendo carbono del ciclo de TCA a piruvato mientras se generaba NADPH, mostró un título aumentado a partir de la misma cantidad de glucosa cuando se comparó con una cepa parental (CMP678) (figura 14). CMP729, con la mutación de *pdhR*, tenía una velocidad de crecimiento más lenta que la cepa parental (figura 13). Las mutaciones PL.6pdh y GI1.2maeB no afectaron al crecimiento (figura 13).

Ejemplo 27: Producción de isopreno a partir de *E. coli* que expresan genes de la ruta de mevalonato e isopreno sintasa, hechos crecer en cultivo semicontinuo en la escala de 15 l.

(i) *Materiales*

Fórmula del medio (por litro de medio de fermentación):

7,5 g de K_2HPO_4 , 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 0,5 g de extracto de levadura, 1,6 ml de ácido sulfúrico al 50 %, 1 ml de disolución de metales traza 1000X modificada. Se añadieron todos los componentes conjuntamente y se disolvieron en DiH_2O . Se esterilizó con calor esta disolución (123 °C durante 20 minutos). Se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de amonio (al 28 %) y c.s. para enrasar. Se añadieron 10 g de glucosa, 8 ml de disolución de vitaminas y antibióticos después de la esterilización y el ajuste del pH.

Disolución de metales traza 1000X modificada (por litro):

40 g de ácidos cítricos $\cdot H_2O$, 30 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3 , 100 mg de $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH_2O , se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de vitaminas (por litro):

1,0 g de clorhidrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,8 g de ácido D-pantoténico, 4,0 g de clorhidrato de piridoxina. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH_2O , se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de alimentación (por kilogramo):

0,57 kg de glucosa, 0,38 kg de DiH_2O , 7,5 g de K_2HPO_4 y 10 g de Foamblast al 100 %. Se mezclaron todos los componentes conjuntamente y se esterizaron en autoclave. Se añadieron 3,4 ml de la disolución de macrosales, 0,8 ml de disolución de metales traza 1000X modificada y 6,7 ml de la disolución de vitaminas después de haberse enfriado la disolución hasta 25 °C.

Disolución de macrosales (por litro):

296 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 296 g de ácido cítrico monohidratado, 49,6 g de citrato de amonio férrico. Se disolvieron todos los componentes en agua, c.s. para enrasar y se esterizaron por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

(ii) *Métodos*

Se realizó la fermentación en un biorreactor de 15 l con células de *E. coli* BL21 que sobreexpresan la ruta de MVA superior (pCLUpper - MCM82), la ruta de MVA inferior (PL.2-mKKDyl) e isopreno sintasa truncada de *P. alba* (pTrcAlba(MEA)) y que contienen un gen *pgl* cromosómico restaurado así como un gen *gltA* silenciado detrás del promotor GI1.2 (nombre de cepa CMP457). La cepa original, usada en la fermentación de control, era una cepa sin el gen *gltA* silenciado.

Este experimento se llevó a cabo para monitorizar la formación de isopreno a partir de glucosa al pH de 7,0 y la temperatura de 34 °C de fermentación deseados. Se descongeló un vial congelado de la cepa de *E. coli* y se inoculó en un matraz con medio de extracto de levadura-triptona y los antibióticos apropiados. Después de que creciese el inóculo hasta una densidad óptica de 1,0, medida a 550 nm (DO_{550}), se usaron 500 ml para inocular un biorreactor de 15 l y llevar el volumen del tanque inicial a 5 l.

Se alimentó la disolución de alimentación a una velocidad exponencial hasta que se alcanzó una velocidad de alimentación superior de 6 g/min. Después de este tiempo, se alimentó la alimentación de glucosa para satisfacer las demandas metabólicas a velocidades menores de o iguales a 6 g/min. La cantidad de glucosa total suministrada al biorreactor durante la fermentación de 52 h fue de 6,8 kg. Se logró inducción añadiendo isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se añadió una inyección de IPTG al tanque para llevar la concentración a 100 μM cuando las células estaban a una DO_{550} de 6 y se añadió una segunda inyección para llevar la concentración a 100 μM cuando las células estaban a una DO_{550} de 100.

Se determinó el nivel de isopreno en el gas de descarga del biorreactor usando un espectrómetro de masas iSCAN (Hamilton Sundstrand).

5 (iii) *Resultados*

La fermentación con promotor de gltA GI1.2 delante de gltA tuvo un mayor rendimiento que su control de cepa parental (figura 15). El título, la productividad volumétrica y el índice de productividad celular de isopreno también fueron mayores en la cepa GI1.2gltA. Se resumen los resultados en la tabla 15 (a continuación).

10

Tabla 15: Parámetros de productividad de isopreno (GI1.2gltA frente a gltA de tipo natural)

Descripción de la cepa	EFT (h)	Título (g/l)	Productividad volumétrica (g/l/h)	% de rendimiento global de MVA sobre glucosa (g/g)	CPI (g de MVA/g de DCW)
CMP457 (GI1.2 promotor delante de gltA)	52	113,0	1,60	10,7 %	1,65
MD09-317 (promotor wt delante de gltA)	53	77,6	0,92	8,6 %	0,79

15

Ejemplo 28: Producción de mevalonato (MVA) a partir de *E. coli* que expresan genes de la ruta de mevalonato y hechos crecer en cultivo semicontinuo a la escala de 15 l.

(i) *Materiales*

20

Fórmula del medio (por litro de medio de fermentación):

25

7,5 g de K₂HPO₄, 2 g de MgSO₄*7H₂O, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 0,5 g de extracto de levadura, 1,6 ml de ácido sulfúrico al 50 %, 1 ml de disolución de metales traza 1000X modificada. Se añadieron todos los componentes conjuntamente y se disolvieron en DiH₂O. Se esterilizó con calor esta disolución (123 °C durante 20 minutos). Se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de amonio (al 28 %) y c.s. para enrasar. Se añadieron 10 g de glucosa, 8 ml de disolución de vitaminas y antibióticos después de la esterilización y el ajuste del pH.

Disolución de metales traza 1000X modificada (por litro):

30

40 g de ácidos cítricos*H₂O, 30 g de MnSO₄*H₂O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO₄*7H₂O, 1 g de CoCl₂*6H₂O, 1 g de ZnSO₄*7H₂O, 100 mg de CuSO₄*5H₂O, 100 mg de H₃BO₃, 100 mg de NaMoO₄*2H₂O. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH₂O, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

35

Disolución de vitaminas (por litro):

40

1,0 g de clorhidrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de clorhidrato de piridoxina. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH₂O, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de alimentación (por kilogramo):

45

0,590 kg de glucosa, 0,393 kg de DiH₂O, 7,4 g de K₂HPO₄ y 8,9 g de Foamblast 882 al 100 %. Se mezclaron todos los componentes conjuntamente y se esterizaron en autoclave.

Disolución de macrosales (por litro):

50

296 g de MgSO₄*7H₂O, 296 g de ácido cítrico monohidratado, 49,6 g de citrato de amonio férrico. Se disolvieron todos los componentes en agua, c.s. para enrasar y se esterizaron por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros. Estrategia de adición A (ejecuciones con GI1.2gltA): añadir 16,8 ml directamente a los medios del tanque antes de la esterilización, sin ninguna adición adicional. Estrategia de adición B: (ejecución con gltA wt): añadir 6,895 ml por litro de disolución de alimentación de glucosa.

55

(ii) *Métodos*

Se realizó la fermentación en un biorreactor de 15 l con células de *E. coli* BL21 que expresan la ruta de MVA superior (pCLUpper) y que contienen un gen *pgl* cromosómico restaurado. Por tanto, se compararon tres cepas productoras de mevalonato.

MCM1002 (promotor wt delante de *gltA*, *E. faecalis* superior) (véase el ejemplo 12)

CMP678 (promotor GI1.2 delante de *gltA*, *E. faecalis* superior) (véase la tabla 3).

5 CMP680 (huésped de *ackA-pta*, *ldhA*, *GI1.2gltA*, *E. faecalis* superior) (véase el ejemplo 5)

10 Este experimento se llevó a cabo para monitorizar la formación de mevalonato a partir de glucosa al pH de 7,0 y la temperatura de 34 °C de fermentación deseados. Se descongeló un vial congelado de la cepa de *E. coli* y se inoculó en un matraz con medio de extracto de levadura-triptona y los antibióticos apropiados. Después de que creciese el inóculo hasta una densidad óptica de 1,0, medida a 550 nm (DO_{550}), se usaron 500 ml para inocular un biorreactor de 15 l y llevar el volumen del tanque inicial a 5 l.

15 Los medios por lotes tenían glucosa añadida en lotes a 9,9 g/l. Se logró inducción añadiendo isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se añadió una inyección de IPTG al tanque para llevar la concentración a 400 μ M cuando las células estaban a una DO_{550} de 6. Una vez que se consumió la glucosa por el cultivo, tal como se señala mediante un aumento del pH, se alimentó la disolución de alimentación de glucosa para satisfacer las demandas metabólicas a velocidades menores de o iguales a 10 g/min. Se ejecutó la fermentación durante suficiente tiempo como para determinar el rendimiento en masa de mevalonato máximo sobre glucosa, un tiempo de fermentación transcurrido de al menos 36 h.

20 (iii) Conclusiones

25 La fermentación con el silenciamiento de *GI1.2 gltA* (CMP678) tuvo un mayor rendimiento de mevalonato sobre glucosa que su control de cepa parental (MCM1002). Adicionalmente, se observaron un mayor índice de productividad celular, productividad volumétrica y título de mevalonato (figuras 20, 21 y 24, respectivamente, se resumen en la tabla 16).

Tabla 16: Parámetros de productividad de MVA (*GI1.2gltA* frente a *gltA* de tipo natural)

Descripción de la cepa	EFT (h)	Título (g/l)	Productividad volumétrica (g/l/h)	% de rendimiento global de MVA sobre glucosa (g/g)	CPI (g de MVA/g de DCW)
MCM1002 (<i>gltA</i> wt, <i>E. faecalis</i> superior)	36,4	70,8	1,95	17,5 %	1,80
CMP678 (<i>GI1.2gltA</i> , <i>E. faecalis</i> superior)	36,0	137,1	3,81	35,1 %	3,28

30 La fermentación con el huésped "triple" (CMP680) tuvo un mayor índice de productividad celular y un mayor rendimiento en masa de mevalonato global sobre glucosa que la cepa CMP678 (figura 23 y figura 24, respectivamente). Muy pronto en la fermentación de CMP680, el rendimiento en masa de mevalonato sobre glucosa y la productividad específica de mevalonato (g/l/h/DO) fueron mucho mayores que los de CMP678 o MCM1002. (Figura 24 y figura 25, respectivamente). En la fermentación de CMP680, la productividad volumétrica y concentración de mevalonato en caldo de mevalonato fueron menores frente a CMP678 (figura 26 y figura 27, respectivamente). Se resumen los resultados en la tabla 17. La cepa CMP680 (o, el huésped con triple mutación o huésped triple) es útil para determinar el rendimiento en masa de mevalonato máximo sobre glucosa y la productividad específica máxima en experimentos de fermentación de 15 l.

40 Tabla 17: Parámetros de productividad de mevalonato (MVA) (huésped "triple" frente a *GI1.2gltA* frente a *gltA* de tipo natural)

Descripción de la cepa	EFT (h)	Título (g/l)	Productividad volumétrica (g/l/h)	% de rendimiento global de MVA sobre glucosa (g/g)	CPI (g de MVA/g de DCW)
MCM1002 (<i>gltA</i> wt, <i>E. faecalis</i> superior)	36,4	70,8	1,95	17,5 %	1,80
CMP678 (<i>GI1.2gltA</i> , <i>E. faecalis</i> superior)	36,0	137,1	3,81	35,1 %	3,28
CMP680 (huésped de <i>ackA</i> , <i>pta</i> , <i>ldh</i> , <i>GI1.2gltA</i> , <i>E. faecalis</i> superior)	36,2	109,5	3,03	36,1 %	3,75

45 36 h son suficientes para obtener una lectura del rendimiento en masa de mevalonato, pero pueden ampliarse las ejecuciones para aumentar la concentración en caldo de mevalonato. Una tabla muestra los títulos pico observados en estos experimentos. Los resultados observados a los títulos pico se resumen en la tabla 18, a continuación.

Tabla 18: Parámetros de productividad de mevalonato (MVA) a título pico (huésped "Triple" frente a G11.2gltA frente a gltA de tipo natural)

Descripción de la cepa	EFT a título pico (h)	Título pico (g/l)	Productividad volumétrica a título pico (g/l/h)	% de rendimiento global de MVA sobre glucosa a título pico (g/g)	CPI a título pico (g de MVA/g de DCW)
MCM1002 (gltA wt, <i>E. faecalis</i> superior)	36,4	70,8	1,95	17,5 %	1,80
CMP678 (G11.2gltA, <i>E. faecalis</i> superior)	52,0	156,0	3,00	37,2 %	4,15
CMP680 (huésped de ackA, pta, ldh, G11.2gltA, <i>E. faecalis</i> superior)	55,2	124,6	2,26	38,0 %	4,39

5 (iv) Análisis del caldo

Se determinó la concentración de mevalonato en el caldo de fermentador en muestras de caldo tomadas a intervalos de 4 horas mediante un análisis de HPLC. Se determinó la concentración en caldo de mevalonato en muestras mediante comparación de la respuesta de índice de refracción frente a una curva de calibración generada previamente obtenida mediante la ejecución de una disolución de mevalonato de alta pureza preparada (Sigma Aldrich).

Información de HPLC:

15 Sistema: 2695 de Waters Alliance; Columna: columna de exclusión iónica de BioRad - Aminex HPX-87H de 300 mm × 7,8 mm, n.º de catálogo 125-0140; temperatura de columna: 50 °C; precolumna: un recambio de BioRad - Microguard Cation H de 30 mm × 4,6 mm, n.º de catálogo 125-0129; tampón de ejecución: H₂SO₄ 0,01 N; velocidad de flujo de tampón de ejecución: 0,6 ml/min; presión de ejecución aproximada: ~1100-1200 psi; volumen de inyección: 20 microlitros; detector: índice de refracción (Knauer K-2301); tiempo de ejecución: 26 minutos.

20 Ejemplo 29: Producción de cepas de *E. coli* que expresan el gen de mevalonato cinasa de *Metanococcoides burtonii* DSM6242

25 Este ejemplo detalla la construcción de cepas bacterianas que comprenden mevalonato cinasa del microorganismo metanógeno psicrotolerante *M. burtonii* para la producción de isoprenoides, precursores de isoprenoides e isopreno a través de la ruta de mevalonato heteróloga en *E. coli*.

I. Identificación de genes y construcción de la ruta

30 Identificación/selección de genes: se realizó una búsqueda de homología de secuencia primaria usando el producto del gen de mevalonato cinasa de *M. mazei* como consulta mediante el programa BLASTp ubicado en el sitio web de NCBI (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Se seleccionaron secuencias de interés de los resultados de búsqueda. La mevalonato cinasa de *M. burtonii* tiene una identidad de secuencia del 61 % en comparación con la mevalonato cinasa de *M. mazei*.

40 Plásmidos para la expresión de MVK: se sintetizaron plásmidos para la expresión de mMVK y bMVK con cola de His de manera N-terminal mediante GeneOracle. Se clonaron genes de MVK con cola en pET24b bajo el control de un promotor de T7. Se introdujeron los plásmidos en células Invitrogen OneShot BL21(DE3) (n.º C6000-03) siguiendo el protocolo del fabricante y se seleccionaron transformantes sobre placas de La kan50 a 37 °C durante la noche.

45 Rutas de isoprenoides inferiores que expresan mMVK y bMVK a diferentes niveles: se modificó un constructo existente (PL.2-mKKDyl, documento US2011/0159557) que expresa la ruta de MVA inferior (MVK, PMK, MVD, IDI) para expresar mMVK a diferentes niveles y para expresar bMVK en lugar de mMVK. El nuevo constructo consiste en un marcador de resistencia a cloranfenicol flanqueado por FRT, el promotor PL.2, una secuencia de iniciación de la traducción bicistrónica, uno de dos genes de MVK, y los genes de PMK, MVD y IDI. Se construyó un producto de PCR en dos partes para reemplazar el promotor existente, la secuencia de iniciación de la traducción y el gen de MVK por un marcador cmpR escindible, un promotor, la secuencia de iniciación de la traducción y el gen de MVK. Este producto de PCR se introdujo sobre el cromosoma mediante doble cruzamiento seguido por selección de células cmpR.

La secuencia de iniciación de la traducción bicistrónica se usa para aumentar la expresión de MVK iniciando la traducción del ARNm independientemente de la secuencia de MVK. Véase Schoner *et al.*, Translation of a synthetic

b-cistron mRNA in *Escherichia coli* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, págs. 8506-8510, noviembre de 1986). La traducción del ORF de MVK se controla modulando la fuerza del RBS en el sentido de 5' en el constructo bicistrónico. Se diseñaron RBS de fuerza variada usando RBS Calculator (Salis, *et al.*, Nat Biotechnol. Octubre de 2009; 27(10): 946-950.) El software de optimización RBS Calculator se usó con parámetros termodinámicos de ARN calculados usando el paquete de ARN de Vienna v.1.8.4 (<http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/>, Andreas R. Gruber, Ronny Lorenz, Stephan H. Bernhart, Richard Neubuck e ivo L. Hofacker (NAR, 2008) y el módulo ViennaRNA para RBS Calculator. Se calcularon RBS en un servidor Linux que ejecuta Python v. 2.4.3. Se diseñaron RBS usando la 5-UTR en el sentido de 5' del RBS (hasta 50 nt) y 50 nt de la secuencia de ORF. Se calcularon múltiples RBS de una fuerza de diana dada; se sintetizaron uno o más y se sometieron a prueba.

Se usó el molde de cloranfenicol GeneBridges (n.º A105) como molde para amplificar la mitad en el sentido de 5' del constructo usando los cebadores MCM545 y MCM770. Se combinaron 140 µl de ddH₂O, 4 µl de ADN de plásmido (~100 ng/µl), 5 µl de cada cebador 10 µM, 2 µl de dNTP, 40 µl de tampón y 4 µl de polimerasa y se tomaron alícuotas de 4x50 µl. Estas reacciones se ciclaron según el protocolo del fabricante (kit de fusión de Herculanase II de Agilent, n.º 600677) en un programa de PCR que consiste en el siguiente ciclo: 95 °C 2:00, (95 °C 0:20, 55 °C 0:20, 72 °C 1:15) x30, 72 °C 3:00, 4 °C hasta que estuviesen frías. Se purificaron las columnas en columnas de limpieza de PCR Qiagen (n.º 28106), se eluyeron en 50 µl y se reservaron.

Se amplificó la mitad en el sentido de 3' del constructo usando el gen de MVK como molde y los cebadores indicados en la tabla 22, a continuación. Se combinaron 35 µl de ddH₂O, 1 µl de ADN de plásmido (~100 ng/µl), 1,25 µl de cada cebador 10 µM, 0,5 µl de dNTP, 10 µl de tampón y 1 µl de polimerasa y ciclaron de la siguiente manera: 95 °C 2:00, (95 °C 0:20, 55 °C 0:20, 72 °C 0:30 (mMVK) o 72 °C 1:00 (bMVK)) x30, 72 °C 3:00, 4 °C hasta que estuviesen frías. Se purificaron las columnas en columnas de limpieza de PCR Qiagen y se eluyeron en 50 µl.

Se mezclaron 5 µl de fragmentos en el sentido de 5' y en el sentido de 3' con 10 µl de tampón, 0,5 µl de dNTP y 27 µl de ddH₂O y se sometieron a ciclos de PCR: 95 °C 2:00, (95 °C 0:20, 55 °C 0:20, 72 °C 2:00)x5, t.a. se añadieron 1,25 µl de cebador MCM120 y o bien el cebador MCM162 (mMVK) o bien MCM790 (bMVK) y se ejecutaron 25 ciclos más. Se llevó esta reacción de PCR a 4 °C antes de la purificación en columna de PCR Qiagen y elución en 30 µl de EB.

Los productos de PCR fusionados, purificados se sometieron a electroporación en células MCM1332 (para mMVK) o MCM1859 (para bMVK). MCM1332 es un subcultivo de CMP522 (CMP451 (IDN 31588) que porta pRed/ET-carb, GeneBridges) y MCM1859 es un subcultivo de CMP1103 (CMP1075 (IDN 31308) que porta pRed/ET-carb, GeneBridges). Se hicieron crecer los cultivos durante la noche en LB carb50 a 30 °C. Se usaron 100 µl de cultivo para inocular 5 µl de LB carb50 y se hicieron crecer los cultivos a 30 °C hasta que fueron turbios de manera visible (~2 h). Se añadieron 150 µl de arabinosa 1 M y se hicieron crecer los cultivos a 37 °C durante ~2 h. Se sedimentaron las células, se lavaron tres veces en ddH₂O estéril, helada, y se resuspendieron a un volumen de cultivo de 1/10 en ddH₂O estéril, helada. Se mezclaron 100 µl de células con 3 µl de producto de PCR y se sometieron a electroporación en una cubeta electroporación de 2 mm, a 25 µFD, 200 ohmios, 2,5 kV, y se extinguió inmediatamente con 500 µl de LB. Se recuperaron las células transformadas agitando a 37 °C durante ~3 h y se seleccionaron durante la noche sobre placas de LB cmp5 a 37 °C.

Se sembraron en estrías múltiples colonias de cmpR para dar colonias individuales y se examinaron para determinar su integración esperada mediante PCR y secuenciación. Se hicieron crecer cepas purificadas de colonias en LA cmp5, se llevaron a glicerol al 33 % y se almacenaron a -80 °C.

Tabla 19. Cepas de *E. coli* que expresan genes de MVK alternativos

Cepa con ruta modificada	MVK	Fuerza de diana de 5'-RBS	Molde de PCR	Cebador superior en el sentido de 5'	Cebador inferior en el sentido de 5'	Cebador superior en el sentido de 3'	Cebador inferior en el sentido de 3'
MCM1742	<i>mazei</i>	1000	pMCM376 (documento 12/818.090)	MCM545	MCM770	MCM773	MCM162
MCM1743	<i>mazei</i>	100000	pMCM376	MCM545	MCM770	MCM778	MCM162
MCM1745	<i>mazei</i>	1000000	pMCM376	MCM545	MCM770	MCM781	MCM162
MCM1747	<i>mazei</i>	10000	pMCM376	MCM545	MCM770	MCM775	MCM162
MCM1861	<i>burtonii</i>	10000	pMCM1666	MCM545	MCM770	MCM789	MCM790

II. Huéspedes para producir isopreno usando mMVK y bMVK a diferentes niveles

Se transdujeron las rutas de MVA inferior modificadas en MCM2029 (un subcultivo de CMP1133, IDN 31308) para crear huéspedes de producción de isopreno.

Se prepararon lisados de P1 de las cepas MCM1742, 1753, 1745, 1747 y 1861 (rutas transducidas) de la siguiente manera. Se diluyeron 100 µl de cultivo durante la noche en LB cmp5 en 10 ml de LB + CaCl₂ 5 mM, glucosa al 0,2 %, cmp5 y se agitó a 250 rpm, 37 °C durante 30 min. Se añadieron 100 µl del lisado de P1 preparado sobre células MG1655 y se agitó el cultivo durante al menos 3 horas hasta que los medios estaban claros con material celular lisado precipitado. Se agitaron en vórtex los lisados con 100 µl de cloroformo, se centrifugaron 5 min a 3000 rpm, y se almacenó el sobrenadante sobre 100 µl de cloroformo a 4 °C.

Se lavó el cultivo durante la noche de MCM2029 (receptor para la transducción) en un volumen de ½ de manera estéril de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM. Se mezclaron 200 µl de suspensión celular con 100 µl de lisado y se incubó, inmóvil, a 30 °C durante 30 min. Se añadieron 150 µl de citrato de Na 1 M y 500 µl de LB y se recuperó la reacción, con agitación, a 37 °C durante 1-2 horas. Se sembraron en placa las diluciones sobre LA cmp5 y se incubó a 37 °C durante la noche. Se realizaron controles negativos (sin células o sin lisado de transducción) en paralelo. Se escogieron colonias resistentes a cloranfenicol, se volvieron a sembrar en estrías y se sometieron a prueba las colonias individuales mediante PCR para determinar la presencia de la nueva ruta. Se hicieron crecer las cepas resultantes, huéspedes con marcador, hasta la fase semilogarítmica en LA y se almacenaron a -80 °C en glicerol al 33 %.

Se retiró el marcador de resistencia a cloranfenicol en los huéspedes con marcador usando la F1p recombinasa expresada a partir del plásmido pCP20 (GeneBridges). Se hicieron crecer células hasta la fase semilogarítmica en LB cmp5 a 37 °C, se sometieron a electroporación con 1 µl de pCP20 (~100 ng/µl), se recuperaron en LA a 30 °C durante 1-3 h, y se seleccionaron transformantes sobre LA carb50 a 30C durante la noche o a temperatura ambiente durante 3 días. Se escogió una colonia individual, se hizo crecer en LA carb50 a 30 °C hasta que fue turbia de manera visible, y entonces se cambió a 37 °C durante varias horas. Se sembró en estrías este cultivo y se hizo crecer a 37 °C durante la noche. Se escogieron colonias individuales y se sembraron en parches en LA, LA carb50 y LA cmp5. Se seleccionó un clon sensible a carb y cmp para cada cepa parental. Se hicieron crecer los huéspedes de producción de isopreno resultantes (tabla 20) hasta la fase semilogarítmica en LB y se almacenaron a -80 °C en glicerol al 33 %.

Tabla 20: Huéspedes de producción de isopreno

Huéspedes de producción isopreno	Huéspedes de marcador	Huéspedes con	Receptor para la transducción	Rutas transducidas
MCM2065	MCM2050		MCM2029	MCM1861
MCM2066	MCM2053		MCM2029	MCM1742
MCM2067	MCM2054		MCM2029	MCM1743
MCM2069	MCM2057		MCM2029	MCM1745
MCM2070	MCM2059		MCM2029	MCM1747

III. Plásmidos para la expresión de isopreno sintasa sin mMVK

Se modificó el plásmido pDW166 (variantes de Trc *P. alba* IspS, MEA (Carb50)) para expresar bMVK en vez de mMVK. Se amplificó el gen de bMVK a partir de pMCM1666 con los cebadores MCM810 y MCM811 y el vector pDW166, menos el gen de mMVK, se amplificó con los cebadores MCM808 y MCM809 (kit de fusión Herculase II, 35 µl de ddH₂O, 1 µl de molde (~100 ng/µl), 0,5 µl de dNTP, 1,25 µl de cada cebador a 10 µM, 1 µl de polimerasa). Se ciclaron las reacciones de la siguiente manera: 95 °C 2:00, 30x(95 °C 0:20, 55 °C 0:20, 72 °C 0:45 (inserto) o 3:00 (vector)), 72 °C 3:00, 4 °C hasta que estuviesen frías. Se purificaron los productos de PCR en una columna de PCR Qiagen y se eluyeron en 30 µl de EB. Se clonó el inserto en el vector usando el kit de clonación y ensamblaje GeneArt Seamless (Invitrogen n.º A13288) en una reacción que consistía en 2 µl de cada producto de PCR, 4 µl de tampón, 10 µl de ddH₂O y 2 µl de enzima. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 30 min, entonces se transformaron 4 µl en células químicamente competentes TOP10 de Invitrogen. Tras la recuperación en 250 µl de LB a 37 °C durante 1 h, se seleccionaron los transformantes sobre placas de LA carb50 a 37 °C durante la noche. Se secuenció el plásmido minipreparado.

Se modificó el plásmido pDW166 (pTrcAlba (variantes MEA, IspS)-mMVK para delecionar la mayoría del gen de mMVK. Se amplificó el plásmido en una reacción de PCR usando los cebadores MCM814 y 815 (kit de fusión Herculase II, 35 µl de ddH₂O, 1 µl de molde (~100 ng/µl), 0,5 µl de dNTP, 1,25 µl de cada cebador a 10 µM, 1 µl de polimerasa). Se ciclaron las reacciones de la siguiente manera: 95 °C 2:00, 30x (95 °C 0:20, 55 °C 0:20, 72 °C 3:30 (vector)), 72 °C 3:00, 4 °C hasta que estuviesen frías. Se desaló el producto de PCR en un disco VSWP02500 de Millipore que flotaba sobre ~10 µl de ddH₂O durante ~15 minutos y entonces se sometieron a electroporación conjunta 5 µl en células MCM2065. Tras la recuperación en 500 µl de LB a 37 °C durante 1 h, se seleccionaron los transformantes sobre placas de LA carb50 a 37 °C durante la noche. Se secuenció el ADN minipreparado.

IV. Cepas para la producción de isopreno por mMVK y bMVK a diferentes niveles

Se hicieron crecer cepas huésped (tabla 20) en 5 µl de LB a 37 °C, 250 rpm hasta la fase semilogarítmica. Se lavó el cultivo helado en ddH₂O estéril, helada tres veces y se resuspendió en un volumen de cultivo de 1/10. Se mezclaron 100 µl de suspensión celular con 1 µl de ADN de plásmido (~100 ng/ul) en un tubo Eppendorf. Se transformaron todas las cepas con pMCM2095. MCM2065 también se transformó con 1 µl de cada uno de pMCM2020 y pMCM1225 (IDN 31552). Se transfirieron las reacciones a una cubeta de electroporación de 2 mm, se sometieron a electroporación a 25 uFD, 200 ohmios, 2, kV, y se extinguió inmediatamente con 500 µl de LB. Se recuperaron las reacciones agitando a 37 °C durante al menos una hora y se seleccionaron transformantes durante la noche a 37 °C sobre placas de LA con carb50 (y también spec50 en el caso de MCM2065 cotransformado con pMCM2020 y pMCM1225). Se hizo crecer una colonia para cada transformación hasta la fase semilogarítmica en LB con antibióticos, se llevó a glicerol al 33 % y se almacenó a -80 °C (huésped con IspS). Se almacenó la cepa MCM2131 de la misma manera. Se hicieron crecer las cepas huésped con IspS en LB carb50 y se sometieron a electroporación con pMCM1225, seleccionándose los transformantes sobre LA carb50 spec50. De nuevo, se hicieron crecer colonias individuales en LB carb50 spec50, se llevaron a glicerol al 33 %, y se almacenaron a -80 °C (cepa de producción, tabla 21).

Tabla 21 Cepas de producción

Cepa producción	de	Plásmido de ruta superior	Huésped con IspS	Plásmido de IspS	Huésped
MCM2125		pMCM1225	MCM2099	pMCM2095	MCM2065
MCM2126		pMCM1225	MCM2100	pMCM2095	MCM2066
MCM2127		pMCM1225	MCM2101	pMCM2095	MCM2067
MCM2129		pMCM1225	MCM2103	pMCM2095	MCM2069
MCM2130		pMCM1225	MCM2104	pMCM2095	MCM2070
MCM2131		pMCM1225	N/A	pMCM2020	MCM2065

Tabla 22: Cebadores usados para la producción de cepas huésped

MCM162	TTAATCTACTTTCAGACCTTGC
MCM545	aaagttagccgaagatgacggtttgtcacatggagttggcaggatgtttgattaaaagcAATTAACCCTCACTAAAGGGCGG
MCM770	TCCTGCTGATGTGCTCAGTATCACCGCCAGTGGTATTTAAGTCAACACCGCCAGAGATAATTTATCACCGCAGATGGTTATCTTAATACGACTCACTATAGGGCTCG
MCM773	ggcggtgatactgagcacatcagcaggacgcactgcTCTAAGGATTAAGAGGAGAAGATTTCTGatgtatcgatttaaataaggagggaataacatattgtatcctgttctgcgccg
MCM775	ggcggtgatactgagcacatcagcaggacgcactgcTCTAGGGGCGATTAGGGGACCTACTACatgtatcgatttaaataaggagggaataacatattgtatcctgttctgcgccg
MCM778	ggcggtgatactgagcacatcagcaggacgcactgcTCTAGAGCGCACTAAGGAGGCAACTGGatgtatcgatttaaataaggagggaataacatattgtatcctgttctgcgccg
MCM781	ggcggtgatactgagcacatcagcaggacgcactgcTGCAGCGAGGAGGTAAGGGatgtatcgatttaaataaggagggaataacatattgtatcctgttctgcgccg
MCM789	ggcggtgatactgagcacatcagcaggacgcactgcTCTAGGGGCGATTAGGGGACCTACTACatgtatcgatttaaataaggagggaataacatATGATAACGTGCTCTGCGCC
MCM790	GGCTCTCAACTCTGACATGTTTTTTTCTCCTTAAGGGTGCAGGCCTATCGCAAATTAGCttactgacattctacgcaaca
MCM810	GTTTAAACTTTAACTAGACTTTACTGACATTCTACGCGAACACCG
MCM811	cataaaggaggtaaaaaaacATGATAACGTGCTCTGCGCCG
MCM814	gggtaagattagtctagttaaagttaaac
MCM815	TAAGTAGACTAATCTTACCCGGCGCAGAAC

V. Purificación de proteínas

Expresión y purificación de proteínas: se hizo crecer la cepa de *E. coli* MCM1666 que albergaba el gen de mevalonato cinasa de *M. burtonii* a 34 °C en 1 l de caldo Terrific que contiene kanamicina 50 mg/l. Se indujeron las células con IPTG 50 µM a DO₆₀₀ = 0,6 y se recogieron mediante centrifugación 5 horas después de inducción. Se resuspendieron los sedimentos celulares en tampón de fosfato de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 0,3 M, imidazol 0,02 M (pH 8,0) que contiene ADNasa I 0,2 mg/ml y 0,5 mM de clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo (AEBF) tras un ciclo congelación-descongelación. Se logró la lisis mediante pases

repetidos a través de una celda de presión francesa a 20 000 psi. Se clarificaron los lisados celulares mediante ultracentrifugación a 229 000xg durante una hora. Se filtraron los sobrenadantes a través de un filtro de 0,2 μ y se cargaron en una columna HiTrap IMAC HP cargada con sulfato de níquel y equilibrada con fosfato de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 0,3 M, imidazol 0,02 M (pH 8,0). Se aisló mevalonato cinasa usando un gradiente lineal de 0,02 a 0,5 M de imidazol. Se identificaron las fracciones que contenían la mevalonato cinasa usando SDS-PAGE (Invitrogen) y se desalaron en Tris 0,05 M, cloruro de sodio 0,05 M (pH 7,4) usando una columna de desalación Hi Prep 26/10. La fracción de mevalonato cinasa final fue del 95 % cuando se evaluó mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie. Se realizó la cuantificación usando las lecturas de un espectrofotómetro a 280 nm (factor de conversión igual 0,3 DO/mg/ml, VectorNTI).

Se describieron previamente el aislamiento, la purificación y el análisis cinético de MKV de *M. de mazei* en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0086978.

Ejemplo 30: Solubilidad de mevalonato cinasas de *M. burtonii* y de *M. mazei* a partir del plásmido pET24b en las cepas MCM1666 y MCM1669

Este ejemplo examina la solubilidad respectiva de mevalonato cinasas derivadas de *M. burtonii* y *M. mazei*.

(i) *Materiales y métodos*

Se hicieron crecer las cepas MCM1666 y MCM1669 a 34 °C en 5 ml de medio LB que contiene kanamicina 50 mg/l. Se indujeron las células con IPTG 50 μ M a $DO_{(600)} = 0,6$ y se recogieron mediante centrifugación 4 horas después de la inducción. Se prepararon lisados celulares en Tris 50 mM, NaCl 50 mM (pH 7,4) con ADNasa I 0,2 mg/ml y AEBSF 0,5 mM y se hicieron pasar dos veces a través de la celda de presión francesa fijada a 700 psi para lograr la lisis. Se analizó la solubilidad de proteínas mediante gel de SDS-PAGE.

(ii) *Resultados*

Cuando se expresa a partir del vector pET24b, la mevalonato cinasa de *M. burtonii* era soluble al 70 %, en la que como mevalonato cinasa de *M. mazei* tenía una solubilidad de aproximadamente el 5 % y el resto de la proteína estaba ubicada en la fracción de sedimento (figura 28).

Ejemplo 31: Análisis cinético e inhibición de mevalonato cinasas de *M. burtonii* y *M. mazei*

Este ejemplo detalla la cinética respectiva de la actividad catalítica y la inhibición de mevalonato cinasas derivadas de *M. burtonii* y *M. mazei*.

(i) *Materiales y métodos*

Se realizó la cinética usando el lector de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices). Se analizaron todos los datos cinéticos usando el programa de gráficos Kaleidagraph 4.0 del software Synergy. Se adquirieron adenosina trifosfato (ATP), fosfoenolpiruvato (PEP), NADH, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, Tris, HEPE, ADNasa I, así como MVP y MVPP de Sigma. Se adquirió ditiotreitol de Fluka. Se adquirió lactato deshidrogenasa de Calbiochem y se adquirió piruvato cinasa de MD biomedical. DMAPP, IPP y GPP se sintetizaron de manera interna.

Se midieron las actividades catalíticas de ambas mevalonato cinasas de *M. burtonii* y de *M. mazei* usando un ensayo espectrofotométrico modificado que acopla la formación de ADP con la síntesis de piruvato y la reducción a lactato. La velocidad de desaparición inicial de NADH sirve como medida de la fosforilación de mevalonato por MVK. Se realizaron los ensayos por triplicado en un formato de placa sin unión de 96 pocillos (n.º de catálogo Costar 9017), a 30 °C. Cada reacción de 100 μ l contenía PEP 0,4 mM, DTT 0,05 mM, NADH 0,32 mM, $MgCl_2$ 10 mM, 2,5 unidades de LDH y 2,5 unidades de PK en HEPES 50 mM, NaCl 50 mM (pH 7,4).

Se determinaron las constantes cinéticas para las mevalonato cinasas de *M. burtonii* y *M. mazei* aplicando un modelo de cinética de sistema birreactante al azar usando cantidades variables de ambos sustratos de ATP y mevalonato. Se sometieron a prueba las siguientes concentraciones: 0,4 mM, 0,2 mM, 0,1 mM y 0,05 mM de mevalonato y 2 mM, 1 mM, 0,5 mM y 0,25 mM de ATP. Se inició la reacción con la adición de 40 nM de mevalonato cinasa de *M. burtonii* purificada o 80 nM (0,25 μ g) de mevalonato cinasa de *M. mazei* purificada. Se monitorizaron los cambios de absorbancia asociados con la cantidad de NADH oxidado a NAD^+ de manera continua a 340 nm y se representaron gráficamente frente al tiempo para determinar la velocidad de reacciones acopladas a mevalonato cinasa. Se realizaron estudios de inhibición de proteínas añadiendo difosfatos de terpenilo (DMAPP, IPP, GPP, MVPP) así como monofosfato de terpenilo MVP a diversas concentraciones a la mezcla de reacción. Se usó mevalonato cinasa de *S. cerevisiae* purificada previamente como control positivo para la inhibición de DMAPP, IPP y GPP mientras que se usó mevalonato cinasa de *S. pneumoniae* como control positivo para la inhibición de MVP y MVPP.

(ii) *Resultados*

Se evaluaron las constantes cinéticas para mevalonato cinasas de *M. burtonii* y *M. mazei* con respecto a ambos de mevalonato y ATP usando modelo de sistema birreactante al azar (tabla 23). La mevalonato cinasa de *M. burtonii* tiene una k_{cat} de 44,4 s^{-1} para mevalonato y una k_{cat} de 74,3 s^{-1} para ATP, mientras que la mevalonato cinasa de *M. mazei* tiene una k_{cat} de 18,3 s^{-1} para mevalonato y una k_{cat} de 26,8 s^{-1} para ATP a 34 °C. Los valores de $K_{a(Mev)}$ para las mevalonato cinasa de *M. burtonii* y *M. mazei* fueron muy similares, de 391 μM y 397 μM respectivamente. Las $K_{b(ATP)}$ fueron de 212 μM para mevalonato cinasa de *M. burtonii* y 460 μM para *M. mazei*.

Tabla 23: Datos cinéticos y de inhibición para mevalonato cinasas derivadas de *M. burtonii* y *M. mazei*

Mevalonato cinasa	Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	$K_{a/b}$ (μM)	V_{max} ($\mu M/s$)	α	$K_i DMAPP$ (μM)	$K_i IPP$ (μM)	$K_i GPP$ (μM)	$K_i MVP$ (μM)	$K_i MVPI$ (μM)
<i>M. burtonii</i>	Mevalonato	44,4	391	1,78	0,52	> 5000	> 5000	> 5000	> 3000	> 5000
	ATP	74,3	212	2,97	3,74					
<i>M. mazei</i>	Mevalonato	18,3	397	1,46	0,23	> 5000	> 5000	> 5000	> 3000	> 1000
	ATP	26,8	460	2,14	1,62					

Ejemplo 32: Crecimiento y productividad de isopreno de cepas de *E. coli* que expresan mevalonato cinasa de *M. burtonii* o *M. mazei* en el cromosoma de *E. coli*

Este ejemplo detalla un examen del crecimiento y la productividad de isopreno en las cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería genética que expresan mevalonato cinasa de *M. burtonii* o mevalonato cinasa de *M. mazei* en el cromosoma de *E. coli* a pequeña escala.

Materiales y métodos

Ensayos de crecimiento: Se inocularon cultivos durante la noche en tubos de agitación que contenían 2 ml de caldo LB complementado con carbenicilina 50 $\mu g/ml$ (Novagen) y espectinomicina 50 $\mu g/ml$ (Novagen) de disoluciones madre congeladas. Entonces se incubaron los cultivos durante 14 h a 34 °C a 240 rpm. A continuación, se diluyeron los cultivos en una placa de 48 pocillos de 5 ml (Axygen Scientific) que contenía 2 ml de medio TM3 complementado con glucosa al 1 %, extracto de levadura al 0,02 %, carbenicilina 50 $\mu g/ml$ y espectinomicina 50 $\mu g/ml$ hasta una DO final de 0,2. Se selló la placa con membrana Breath Easier (Diversified Biotech) y se incubó a 34 °C en un agitador/incubador Shel Lab a 600 rpm. Se indujeron los cultivos con IPTG 200 μM a DO de 0,4. Una hora después de la inducción, se añadió mevalonato a los cultivos hasta una concentración final de 0, 2, 4, 8, 16, 32 mM. Se tomaron mediciones de DO a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 h después de la inducción con IPTG.

Tabla 24: Lista de las cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería genética examinadas a pequeña escala

Nombre de cepa	Genotipo abreviado
CMP1136	pgl-+ pTrcAlba(MEA, G491S)-mMVK + pCL-Ptrc-Upper_Ef
DW708	pgl-+ pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-mMVK + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum
MCM2131	pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS 10000-MVK(burtonii) + pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-bMVK + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum
MCM2125	pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) + pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-mMVK(del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum
MCM2126	pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS 1000-mMVK + pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-mMVK(del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum
MCM2127	pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS 100000-mMVK + pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-mMVK (del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum
MCM2129	pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS 1000000-mMVK + pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-mMVK (del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum
MCM2130	pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS 10000-mMVK + pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-mMVK(del) + pCL-Ptrc-Upper_gallinarum

Productividad de isopreno: se tomaron muestras para análisis de productividad de isopreno mediante CG/EM de las cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería genética a las 1, 2, 3, 4 y 5 h después de la inducción. Se pipetearon 100 μl de caldo de cultivo en un bloque de vidrio de 98 pocillos profundos y se selló con sellador de aluminio (Beckman Coulter). Se incubó el bloque de vidrio durante 30 min en un baño de agua a 34 °C, después de lo cual se transfirió a un baño de agua a 80 °C durante una incubación de destrucción con calor de 2 min. Se enfrió el bloque de vidrio y se transfirió al CG/EM para mediciones de isopreno.

Detección de isopreno mediante CG/EM: Se realizó CG/EM usando un sistema de CG/EM 6890 de Agilent interconectado con un autoinyector CombiPAL de CTC Analytics (Suiza) funcionando en modo de cámara anterior. Se usó una columna de CG/EM HP-5MS de Agilent (30 m x 0,25 mm; grosor de película de 0,25 μm) para la separación de analitos. El método de CG/EM utilizó helio como gas portador a un flujo de 1 ml/min. Se mantuvo el

orificio de inyección a 250 °C con una razón de fraccionamiento de 50:1. Se mantuvo la temperatura de horno a 37 °C durante el periodo de 2 minutos del análisis. Se hizo funcionar el detector selectivo de masas 5793N de Agilent en modo de monitorización de un único ion (SIM) en m/z 67. Se apagó el detector de 1,4 a 1,7 minutos para permitir la elución de gases permanentes. En estas condiciones, se observó que eluía el isopreno (2-metil-1,3-butadieno) a 1,78 minutos. Se usó una tabla de calibración para cuantificar la cantidad absoluta de isopreno y se halló que era lineal de 1 µg/l a 2000 µg/l. Se estimó que el límite de detección era de 50 a 100 ng/l usando este método.

(ii) Resultados

No se inhibe el crecimiento de MCM2131 por concentraciones de mevalonato que oscilan entre 0 y 16 mM. MCM2131 tiene la mayor productividad específica que oscila entre 30-42 mg/l/h/DO con mevalonato 32 mM añadido, por tanto es capaz de soportar un flujo muy alto desde las rutas superiores.

Las cepas MCM2125, MCM2127 y MCM2130 modificadas por ingeniería genética con una copia de mevalonato cinasa cromosómica son capaces de lograr productividades específicas de 40 mg/l/h/DO con mevalonato 16 mM añadido. Tampoco se inhibe su crecimiento por concentraciones de mevalonato de entre 0-16 mM (figura 29).

Ejemplo 33: Plásmido y expresión cromosómica de mevalonato cinasas de *M. mazei* y *M. burtonii* en *E. coli*.

Se ejecutaron las cepas MCM2126 y MCM2127 para determinar si puede obtenerse cualquier beneficio expresando MVK de *mazei* fuera del cromosoma solo.

Materiales y métodos

(i) Disoluciones

Fórmula del medio (por litro de medio de fermentación): 7,5 g de K₂HPO₄, 2 g de MgSO₄*7H₂O, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 0,5 g de extracto de levadura, 1,6 ml de ácido sulfúrico al 50 %, 1 ml de disolución de metales traza 1000X modificada. Se añadieron todos los componentes conjuntamente y se disolvieron en DiH₂O. Se esterilizó con calor esta disolución (123 °C durante 20 minutos). Se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de amonio (al 28 %) y c.s. para enrasar. Se añadieron 10 g de glucosa, 8 ml de disolución de vitaminas y antibióticos después de la esterilización y el ajuste del pH.

Disolución de metales traza 1000X modificada (por litro): 40 g de ácidos cítricos*H₂O, 30 g de MnSO₄*H₂O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO₄*7H₂O, 1 g de CoCl₂*6H₂O, 1 g de ZnSO₄*7H₂O, 100 mg de CuSO₄*5H₂O, 100 mg de H₃BO₃, 100 mg de NaMoO₄*2H₂O. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH₂O, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de macrosales (por litro): 296 g de MgSO₄*7H₂O, 296 g de ácido cítrico monohidratado, 49,6 g de citrato de amonio férrico. Se disolvieron todos los componentes en agua, c.s. para enrasar y se esterilizaron por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de vitaminas (por litro): 1,0 g de clorhidrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de clorhidrato de piridoxina. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH₂O, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de alimentación n.º 1 (por kilogramo): 0,590 kg de glucosa, 0,393 kg de DiH₂O, 7,4 g de K₂HPO₄ y 8,9 g de Foamblast 882 al 100 %. Se mezclaron todos los componentes conjuntamente y se esterilizaron en autoclave. Después de esterilizar en autoclave la disolución de alimentación, se añaden los complementos de nutrientes al frasco de alimentación en una campana de extracción estéril. Las adiciones tras la esterilización a la alimentación son (por kilogramo de disolución de alimentación), 5,54 ml de disolución de macrosales, 6,55 ml de disolución de vitaminas, 0,82 ml de disolución de metales traza 1000X modificada.

(ii) Métodos

Se descongelaron las muestras y se normalizaron a DO = 20 en Tris 100 mM, NaCl 100 mM, pH 7,6, ADNasa I 0,1 mg/ml, lisozima 1 mg/ml y AEBSF (clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo) 0,5 mM). Se lisaron las suspensiones celulares normalizadas para la DO mediante pases repetidos a través de la celda de presión francesa a 700 psi. Se clarificaron los lisados mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos. Se evaluaron los lisados clarificados para determinar el contenido de proteína total usando el ensayo de Bradford (BioRad, 500-0006). Entonces se normalizaron las muestras según las proteínas y se ejecutaron en geles de SDS-PAGE al 4-12 % (Life Technologies). Se transfirieron las proteínas sobre membrana de nitrocelulosa usando el aparato de transferencia iBlot (Life Technologies). Se reveló la nitrocelulosa usando la estación de procesamiento de

tarjetas de inmunotransferencia de Western BenchPro™ 4100 (Life Technologies), tratando con sonda o bien para MVK de *M. mazei* y *M. de burtoniis* con anticuerpos policlonales primarios producidos en conejos mediante ProSci incorporado frente a enzimas purificadas y un anticuerpo fluorescente secundario IgG de cabra anti-conejo con Alexa Fluor 488 (Life Technologies, A-11008). Se logró la cuantificación de proteína específica usando software Storm imager y ImageQuant TL de GE Healthcare.

(iii) Resultados

La expresión de mevalonato cinasa de *M. burtonii* en MCM2125 es al menos 15 veces menor que la expresión de mevalonato cinasa de *M. mazei* en la cepa DW708, basándose en la cuantificación de proteína mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (figura 30).

Ejemplo 34: Producción de isopreno en *E. coli*

Este ejemplo evalúa la producción de isopreno en *E. coli* (BL21) que expresa genes introducidos de la ruta de mevalonato y hechos crecer en cultivo semicontinuo a la escala de 15 l. Se ejecutaron cepas productoras de isopreno en un procedimiento de producción de isopreno convencional, descrito a continuación. Los parámetros de rendimiento de la cepa DW708 (rendimiento acumulado de isopreno sobre glucosa, rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa, productividad volumétrica de isopreno, productividad específica e índice de productividad celular) se comparan en este caso con cepas experimentales, MCM2125, MCM2126 y MCM2127. Estas cepas se ejecutaron en las mismas condiciones para determinar si cualquier mejora del rendimiento puede atribuirse al uso de mevalonato cinasa (MVK) de *M. burtonii* en la cepa MCM2125, en comparación con una cepa que usó solo MVK de *M. mazei* (DW708). Adicionalmente, se ejecutaron las cepas MCM2126 y MCM2127 en las mismas condiciones para determinar si puede obtenerse cualquier beneficio expresando MVK de *M. mazei* fuera del cromosoma solo.

Tabla 25. Lista de cepas

Nombre de cepa	Huésped	MVK en cromosoma del huésped	Plásmido superior	Plásmido inferior	MVK en plásmido inferior	Número de ejecuciones
DW708	pgl-	<i>Mazei</i>	pCL P _{trc} E. gallinarum Superior (pMCM1225)	pTrc P. alba IspS (variantes MEA IspS)-mMVK (pDW166)	Sí (<i>Mazei</i>)	20120187 20120260
MCM2125	pgl- FRT-PL. 2-2cis-RBS10000-MVK(<i>burtonii</i>)	<i>Burtonii</i>	pCL-P _{trc} -Upper_gallinarum	pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-mMVK (del)	No	20120188 20120261
MCM2126	pgl- FRT-PL. 2-2cistron-RBS1000-mMVK	<i>Mazei</i> (promotor cromosómico de menor fuerza)	pCL-P _{trc} -Upper_gallinarum	pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-mMVK (del)	No	20120262
MCM2127	pgl- FRT-PL. 2-2cistron-RBS100000-mMVK +	<i>Mazei</i> (promotor cromosómico de mayor fuerza)	+ pCL-P _{trc} -Upper_gallinarum	pTrcAlba(variantes MEA, IspS)-mMVK (del)	No	20120263

(ii) Disoluciones

Fórmula del medio (por litro de medio de fermentación): 7,5 g de K₂HPO₄, 2 g de MgSO₄*7H₂O, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 0,5 g de extracto de levadura, 1,6 ml de ácido sulfúrico al 50 %, 1 ml de disolución de metales traza 1000X modificada. Se añadieron todos los componentes conjuntamente y se disolvieron en DiH₂O. Se esterilizó con calor esta disolución (123 °C durante 20 minutos). Se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de amonio (al 28 %) y c.s. para enrasar. Se añadieron 10 g de glucosa, 8 ml de disolución de vitaminas y antibióticos después de la esterilización y el ajuste del pH.

Disolución de metales traza 1000X modificada (por litro): 40 g de ácidos cítricos*H₂O, 30 g de MnSO₄*H₂O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO₄*7H₂O, 1 g de CoCl₂*6H₂O, 1 g de ZnSO₄*7H₂O, 100 mg de CuSO₄*5H₂O, 100 mg de H₃BO₃, 100 mg de NaMoO₄*2H₂O. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH₂O, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de vitaminas (por litro): 1,0 g de clorhidrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de clorhidrato de piridoxina. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH₂O, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de

0,22 micrómetros.

Disolución de macrosales (por litro): 296 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 296 g de ácido cítrico monohidratado, 49,6 g de citrato de amonio férrico. Se disolvieron todos los componentes en agua, c.s. para enrasar y se esterilizaron por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de alimentación (por kilogramo): 0,590 kg de glucosa, 0,393 kg de DiH_2O , 7,4 g de K_2HPO_4 y 8,9 g de Foamblast 882 al 100 %. Se mezclaron todos los componentes conjuntamente y se esterilizaron en autoclave. Después de esterilizar en autoclave la disolución de alimentación, se añaden los complementos de nutrientes al frasco de alimentación en una campana de extracción estéril. Las adiciones tras la esterilización a la alimentación son (por kilogramo de disolución de alimentación), 5,54 ml de disolución de macrosales, 6,55 ml de disolución de vitaminas, 0,82 ml de disolución de metales traza 1000X modificada.

(ii) Método

Se descongeló un vial congelado de la cepa de *E. coli* y se inoculó en un matraz con medio de extracto de levadura-triptona y los antibióticos apropiados. Después de que creciese el inóculo hasta una densidad óptica de 1,0, medida a 550 nm (DO_{550}), se usaron 500 ml para inocular un biorreactor de 15 l y llevar el volumen del tanque inicial a 5 l.

El gas de entrada que se usó para mantener la contrapresión del biorreactor en 0,7 bar manométrico y para proporcionar el oxígeno a los organismos de producción lo suministró Matheson Tri-Gas, Inc en bombonas de gas comprimido.

Los medios por lotes tenían glucosa por lotes a 9,7 g/l. Se logró inducción añadiendo isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se añadió una inyección de IPTG al tanque para llevar la concentración a 200 μM cuando las células estaban a una DO_{550} de 6. Una vez que se consumió la glucosa por el cultivo, tal como se señala mediante un aumento del pH, se alimentó la disolución de alimentación de glucosa para satisfacer las demandas metabólicas a velocidades menores de o iguales a 10 g/min. La fermentación se ejecutó durante suficiente tiempo como para determinar el rendimiento en masa de isopreno máximo sobre glucosa, un total de 52 a 69 h de tiempo de fermentación transcurrido.

(iii) Análisis

El isopreno es volátil y puede barrerse eficazmente del tanque mediante el gas de entrada. Se determinó el nivel de isopreno en el gas de descarga del biorreactor usando dos espectrómetros de masas, un iSCAN (Hamilton Sundstrand) y un espectrómetro de masas Hiden HPR20 (Hiden Analytical). Se determinaron los niveles de oxígeno, nitrógeno y CO_2 en el gas de descarga mediante las mismas unidades de espec. de masas.

Se mide el oxígeno disuelto en el caldo de fermentación mediante una sonda higiénica, esterilizable con un sensor óptico proporcionado por Hamilton Company.

Se determinaron las concentraciones de citrato, glucosa, acetato y mevalonato en el caldo de fermentador en muestras de caldo tomadas a intervalos de 4 horas mediante un análisis de HPLC. Se determinó la concentración en muestras de caldo mediante comparación la respuesta de índice de refracción frente a una curva de calibración generada previamente usando un patrón de concentración conocida

Información de HPLC: Sistema: 2695 de Waters Alliance; Columna: columna de exclusión iónica de BioRad - Aminex HPX-87H de 300 mm x 7,8 mm, n.º de catálogo 125-0140; temperatura de columna: 50 °C; precolumna: un recambio de BioRad - Microguard Cation H de 30 mm x 4,6 mm N.º de catálogo 125-0129; tampón de ejecución: H_2SO_4 0,01 N; velocidad de flujo de tampón de ejecución: 0,6 ml/min; presión de ejecución aproximada: ~1100-1200 psi; volumen de inyección: 20 microlitros; detector: índice de refracción (Knauer K-2301); tiempo de ejecución: 26 minutos.

(iv) Resultados

Se resumen los resultados en la tabla 26. La cepa que expresa MVK de *M. burtonii* (MCM2125) logró un % de rendimiento acumulado de isopreno sobre glucosa comparable (figura 31), un % de rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa comparable (figura 32), un índice de rendimiento celular comparable (CPI; figura 33), una productividad volumétrica global comparable (figura 34) y una productividad específica comparable (figura 35) frente a la cepa que expresan MVK de *mazei* (DW708).

Tabla 26. Parámetros de productividad de isopreno

Descripción de la cepa / número de ejecución	Productividad volumétrica de isopreno	% de rendimiento acumulado máx.	% de rendimiento instantáneo pico	CPI (g de isopreno/g de DCW) en el	Productividad específica pico (mg de isopreno
--	---------------------------------------	---------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	---

	global (g/l/h) en el momento de rendimiento de isopreno global máx.	de isopreno sobre glucosa (g/g)	de isopreno sobre glucosa (g/g)	momento de rendimiento de isopreno global máx.	l/h/DO)
DW708 20120187	1,96	17,1	19,5	3,19	40,39
DW708 20120260	1,61	16,0	19,0	1,51	28,95
MCM2125 20120188	1,95	17,3	22,4	2,84	38,1
MCM2125 20120261	2,18	16,2	19,5	1,86	35,2
MCM2126 20120262	0,65	7,5	10,08	0,70	19,34
MCM2127 20120263	1,94	15,5	20,23	1,92	28,95

Comparando cepas que expresaron MVK solo fuera del cromosoma, la cepa MCM2125, (que expresó MVK de *M. burtonii*) logró un mejor % de rendimiento acumulado de isopreno sobre glucosa (figura 36), un % de rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa comparable (figura 37), un mayor índice de rendimiento celular (CPI; figura 38), una productividad volumétrica ligeramente mejor (figura 39), y una productividad específica ligeramente mayor frente a la cepa MCM2127 (figura 40), que expresó MVK de *mazei*.

Ejemplo 35: Construcción de la cepa CMP1136 (- PGL)

Se obtuvo un producto de PCR que contenía un casete de kanamicina flanqueado por sitios de FRT y regiones homólogas al sentido de 5' y al sentido de 3' de *pgl* (*ybhE*), usando el método de PCR descrito en el ejemplo 4, cepa de Keio JW0750 (Baba *et al.* 2006. Mol. Syst. Biol. 2:1-11) que contenía un casete de kanamicina en el locus de *pgl*, y los cebadores *pglAmpF* (5'-cagcaaatagcagggtgtatccagc-3') y *pglAmpR* (5'-GCA ACC GAC TGT TGA TAG AAC AAC-3'). Este producto de PCR se usó en una reacción de recombinación (véase el protocolo descrito anteriormente) con *E. coli* CMP1075. Se seleccionó una colonia sobre LB + kanamicina 10 mg/l y se nombró como CMP1125. Se retiró el marcador de kanamicina usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar la cepa CMP1133.

Se verificó CMP1133 mediante PCR con los cebadores *pglAmpF* y *pglRecCheck* (5'-GGT TAC AAA ATG ATT GGC GTA CGC-3') para demostrar la delección del gen de *pgl*. Los plásmidos MCM82 y pCHL243 se sometieron a electroporación de manera concomitante en CMP1133. Se seleccionó una colonia que creció sobre LB + carbenicilina 50 mg/l y espectinomina 50 mg/l y se nombró como CMP1136.

Ejemplo 36: Fermentación a gran escala de CMP1136

Se realizó este experimento para evaluar la producción de isopreno a partir de *E. coli* (BL21) que expresa genes introducidos de la ruta de mevalonato y hechos crecer en cultivo semicontinuo a la escala de 15 l. Se ejecutó una cepa productora de isopreno CMP1082 (HMB G11.2gltA, PyddVIspA_GO, truncIspA, pMCM82, pDW72) en un procedimiento de producción de isopreno convencional, descrito a continuación. Los parámetros de rendimiento (rendimiento acumulado de isopreno sobre glucosa, rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa, productividad volumétrica de isopreno, productividad específica e índice de productividad celular) se comparan con una cepa experimental CMP1136 (HMB G11.2gltA, PyddVIspA_GO, truncIspA, *pgl*-, pMCM82, pDW72) que se ejecutó en las mismas condiciones para identificar una mejora del rendimiento atribuida a la delección del gen *pgl* en CMP1136.

Fórmula del medio (por litro de medio de fermentación): 7,5 g de K₂HPO₄, 2 g de MgSO₄*7H₂O, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 0,5 g de extracto de levadura, 1,6 ml de ácido sulfúrico al 50 %, 1 ml de disolución de metales traza 1000X modificada. Se añadieron todos los componentes conjuntamente y se disolvieron en DiH₂O. Se esterilizó con calor esta disolución (123 °C durante 20 minutos). Se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de amonio (al 28 %) y c.s. para enrasar. Se añadieron 10 g de glucosa, 8 ml de disolución de vitaminas y antibióticos después de la esterilización y el ajuste del pH.

Disolución de metales traza 1000X modificada (por litro): 40 g de ácidos cítricos*H₂O, 30 g de MnSO₄*H₂O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO₄*7H₂O, 1 g de CoCl₂*6H₂O, 1 g de ZnSO₄*7H₂O, 100 mg de CuSO₄*5H₂O, 100 mg de H₃BO₃, 100 mg de NaMoO₄*2H₂O. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH₂O, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

Disolución de vitaminas (por litro): 1,0 g de clorhidrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de clorhidrato de piridoxina. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH₂O, se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

5 Disolución de macrosales (por litro): 296 g de MgSO₄*7H₂O, 296 g de ácido cítrico monohidratado, 49,6 g de citrato de amonio férrico. Se disolvieron todos los componentes en agua, c.s. para enrasar y se esterilizaron por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

10 Disolución de alimentación (por kilogramo): 0,590 kg de glucosa, 0,393 kg de DiH₂O, 7,4 g de K₂HPO₄ y 8,9 g de Foamblast 882 al 100 %. Se mezclaron todos los componentes conjuntamente y se esterilizaron en autoclave. Después de esterilizar en autoclave la disolución de alimentación, se añaden los complementos de nutrientes al frasco de alimentación en una campana de extracción estéril. Las adiciones tras la esterilización a la alimentación son (por kilogramo de disolución de alimentación), 5,54 ml de disolución de macrosales, 6,55 ml de disolución de vitaminas, 0,82 ml de disolución de metales traza 1000X modificada.

15 Este experimento se llevó a cabo para monitorizar la formación de isopreno a partir de glucosa al pH (7,0) y la temperatura (34 °C) de fermentación deseados. Se descongeló un vial congelado de la cepa de *E. coli* y se inoculó en un matraz con medio de extracto de levadura-triptona y los antibióticos apropiados. Después de que creciese el inóculo hasta una densidad óptica de 1,0, medida a 550 nm (DO₅₅₀), se usaron 500 ml para inocular un biorreactor de 15 l y llevar el volumen del tanque inicial a 5 l.

20 Los medios en lotes tenían glucosa en lotes a 9,7 g/l. Se logró inducción añadiendo isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se añadió IPTG al tanque para llevar la concentración a 200 uM cuando las células estaban a una DO₅₅₀ de 6. Una vez que se consumió la glucosa por el cultivo, tal como se señaliza mediante un aumento del pH, se alimentó la disolución de alimentación de glucosa para satisfacer las demandas metabólicas a velocidades menores de o iguales a 10 g/min. La fermentación se ejecutó durante suficiente tiempo como para determinar el rendimiento en masa de isopreno máximo sobre glucosa, un total de 68 a 72 h de tiempo de fermentación transcurrido.

25 **Resultados**

La cepa pgl- (CMP1136) logró un mayor % rendimiento de isopreno sobre glucosa que la cepa pgl+ (CMP1082). Véanse la tabla 27 y la figura 41. La cepa pgl- (CMP1136) logró un mayor % de rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa que la cepa pgl+ (CMP1082) y fue capaz de mantener esta alta productividad durante un periodo de tiempo más largo (~24 h a máx. para pgl- frente a ~12 h a máx. para pgl+). Véanse la tabla 27 y la figura 42. La cepa pgl- (CMP1136) logró un mayor índice de productividad celular que la cepa pgl+ (CMP1082). Al final de la fermentación de 68 a 72 h, la cepa pgl- tuvo un CPI mucho mayor. Además, en el momento de rendimiento de isopreno acumulado máximo sobre glucosa (44 h para la cepa pgl+ y 56 h para la cepa pgl-) el CPI es mayor en la cepa pgl-. Véanse la tabla 27 y la figura 43. La cepa pgl- (CMP1136) logró aproximadamente la misma productividad volumétrica global que la cepa pgl+ (CMP1082). Véanse la tabla 27 y la figura 44. La cepa pgl- (CMP1136) logró aproximadamente la misma productividad específica pico que la cepa pgl+ (CMP1082). Sin embargo, la cepa pgl- (CMP1136) fue capaz de mantener esta alta productividad durante un periodo de tiempo más largo que la cepa pgl+ (CMP1082) y fue notablemente mejor más tarde en la fermentación. Véanse la tabla 27 y la figura 45.

30 Tabla 27. Parámetros de productividad de isopreno

Descripción de la cepa / número de ejecución	% de rendimiento instantáneo pico de isopreno sobre glucosa (g/g)	Productividad volumétrica de isopreno global (g//h) en el momento de rendimiento de isopreno global máx.	% de rendimiento global máx. de isopreno sobre glucosa (g/g)	CPI (g de isopreno/g de DCW) en el momento de rendimiento de isopreno global máx.	Productividad específica pico (mg de isopreno //h/DO)
CMP1082 / 20111110	20,1	1,91	16,3	1,81	30,31
CMP1136 / 20111225	22,3	1,82	17,2	2,73	28,61

35 Ejemplo 37: Construcción de las cepas CMP1237 y CMP1238, que tienen un promotor de fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc) modificado por ingeniería genética

El casete de cloranfenicol FRT-gb2-Cm-FRT de GeneBridges (Heidelberg, Alemania) se amplificó con cebadores 1.2ppcR2 (5'-cgggctttgcttttcgtCAGTGGTTGAATTATTTGCTCAGGATGTGGCATCGTCAAGGGCTAAT ACGACTCACTATAGGGCTCG-3') y ppcF (5'-

gttacttggggcgatttttaacatttcataagttacgcttatttaaagcAATTAACCCCTACTAAAGGGCGG-3'). Se purificó el producto de PCR así obtenido y se usó en una reacción de recombinería según la recomendación del fabricante (GeneBridges) para introducir el constructo en la cepa MG1655 1.6ppc (véase la patente estadounidense n.º 7.745.184, concedida el 29 de junio de 2010). Se amplificó un producto de PCR de la cepa resultante (CMP3_49) usando los cebadores CMP79 (5'-GGA AAC ACG GTT TAT CAA GCC CAC C -3') y CMP80 (5'-cgtgaagatttcgacaacttacgg -3') y se usó en una reacción de recombinería según la recomendación del fabricante (GeneBridges) para introducir el constructo en BL21(DE3). Se preparó un lisado de P1 de esta última cepa y se usó para transducir CMP1133 (expediente interno n.º 40109). Se prepararon lisados de P1 y se usaron según el método descrito en Ausubel, *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. Se seleccionó una colonia sobre LB + cloranfenicol 5 mg/l y se nombró como CMP1230. Se retiró el marcador cloranfenicol usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar la cepa CMP1234. Se introdujeron los pares de plásmidos pMCM82 (documento US2011/0159557) y pDW72 (véase la solicitud de patente estadounidense n.º: 13/283.564) y pMCM1225 (véase la tabla 25) y pDW240 mediante electroporación y selección sobre LB + carbenicilina 50 mg/l + espectinomomicina 50 mg/l. Las cepas así obtenidas se nombraron como CMP1237 y CMP1238, respectivamente.

Ejemplo 38: Producción de isopreno en las cepas que contienen un promotor ppc modificado por ingeniería genética - CMP1237 frente a CMP1136

Este ejemplo examina la producción de isopreno en las cepas que tienen un promotor de fosfoenolpiruvato carboxilasa modificado por ingeniería genética (ppc).

(i) Disoluciones

Fórmula de medios TM3 (por litro de medios de fermentación): 13,6 g de K₂HPO₄, 13,6 g de KH₂PO₄, 2 g de MgSO₄*7H₂O, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 3,2 g de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g de extracto de levadura, 1 ml de disolución de metales traza 1000X. Se añaden todos los componentes conjuntamente y se disuelven en diH₂O. Se ajusta el pH a 6,8 con hidróxido de amonio (al 30 %) y se enrasa. Se esterilizan por filtración los medios con un filtro de 0,22 micrómetros. Se añaden 10,0 g de glucosa y antibióticos después del ajuste del pH y la esterilización.

Disolución de metales traza 1000X (por litro de medios de fermentación): 40 g de ácido cítrico*H₂O, 30 g de MnSO₄*H₂O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO₄*7H₂O, 1 g de CoCl₂*6H₂O, 1 g de ZnSO₄*7H₂O, 100 mg de CuSO₄*5H₂O, 100 mg de H₃BO₃, 100 mg de NaMoO₄*2H₂O. Se disuelve cada componente de uno en uno en diH₂O. Se ajusta el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se enrasa la disolución y se esteriliza por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

(ii) Métodos

Se hacen crecer células durante la noche en caldo de Luria-Bertani + antibióticos. El día después, se diluyen hasta una DO₆₀₀ de 0,1 en 20 ml de medio TM3 que contiene 50 µg/ml de espectinomomicina y carbenicilina 50 µg/ml (en un matraz Erlenmeyer con deflector de 250 ml), y se incuba a 34 °C y 200 rpm. Después de 2 h de crecimiento, se mide la DO₆₀₀ y se añade IPTG 200 µM. Se toman muestras regularmente durante el transcurso de la fermentación. En cada punto de tiempo, se mide la DO₆₀₀. Además, se realiza un análisis de gas de descarga de isopreno usando un ensayo de cámara anterior de cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (CG-EM) (Agilent) (véase la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º: US 2005/0287655). Se ponen cien microlitros de caldo completo en un vial de CG sellado y se incuba a 34 °C y 200 rpm durante un tiempo fijo de 30 minutos. Tras una etapa de destrucción con calor, que consiste en incubación a 70 °C durante 7 minutos, se carga la muestra en el CG. La productividad específica notificada es la cantidad de isopreno en mg/l leída por el CG dividida entre el tiempo de incubación (30 min) y la DO₆₀₀ medida.

(iii) Resultados

Las cepas con el promotor ppc modificado por ingeniería genética (CMP1237) crecieron de manera ligeramente más lenta que las cepas con ppc de tipo natural, CMP1136 (figura 46). La productividad específica de las cepas CMP1237 fue mayor que la productividad específica de CMP1136 (figura 47).

Ejemplo 39: Producción de isopreno en las cepas que contienen un promotor ppc modificado por ingeniería genética a escala de 15 l

Se realizó este experimento para evaluar la producción de isopreno de *E. coli* (BL21) que expresa genes introducidos de la ruta de mevalonato y hechos crecer en cultivo semicontinuo a la escala de 15 l. Se ejecutó una cepa productora de isopreno CMP1136 (HMB G11.2gltA, PyddVlspA_GO, truncIspA, pgl-, pMCM82, pDW72) en un procedimiento de producción de isopreno convencional, descrito a continuación. Los parámetros de rendimiento (rendimiento acumulado de isopreno sobre glucosa, rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa, productividad volumétrica de isopreno, productividad específica y índice de productividad celular) son comparan en este caso con una cepa experimental que se ejecutó en las mismas condiciones para observar si cualquier mejora

del rendimiento puede atribuirse a la expresión del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa detrás del promotor GI1.2 en la cepa experimental, CMP1237(HMB GI1.2gItA, GI1.2ppc, PyddVlspA_GO, truncIspA, pgl-, pMCM82, pDW72).

(i) *Disoluciones*

5 Fórmula del medio (por litro de medio de fermentación): 7,5 g de K_2HPO_4 , 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amonio férrico, 0,5 g de extracto de levadura, 1,6 ml de ácido sulfúrico al 50 %, 1 ml de disolución de metales traza 1000X modificada. Se añadieron todos los componentes conjuntamente y se disolvieron en DiH_2O . Se esterilizó con calor esta disolución (123 C durante 20 minutos). Se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de amonio (al 28 %) y c.s. para enrasar. Se añadieron 10 g de glucosa, 8 ml de disolución de vitaminas y antibióticos después de la esterilización y el ajuste del pH.

15 Disolución de metales traza 1000X modificada (por litro): 40 g de ácidos cítricos $\cdot H_2O$, 30 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3 , 100 mg de $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH_2O , se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

20 Disolución de vitaminas (por litro): 1,0 g de clorhidrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de clorhidrato de piridoxina. Se disolvió cada componente de uno en uno en DiH_2O , se ajustó el pH a 3,0 con HCl/NaOH, y entonces se añadió la c.s. de disolución para enrasar y se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

25 Disolución de macrosales (por litro): 296 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 296 g de ácido cítrico monohidratado, 49,6 g de citrato de amonio férrico. Se disolvieron todos los componentes en agua, c.s. para enrasar y se esterilizaron por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

30 Disolución de alimentación (por kilogramo): 0,590 kg de glucosa, 0,393 kg de DiH_2O , 7,4 g de K_2HPO_4 y 8,9 g de Foamblast 882 al 100 %. Se mezclaron todos los componentes conjuntamente y se esterilizaron en autoclave. Después de esterilizar en autoclave la disolución de alimentación, se añaden los complementos de nutrientes al frasco de alimentación en una campana de extracción estéril. Las adiciones tras la esterilización a la alimentación son (por kilogramo de disolución de alimentación), 5,54 ml de disolución de macrosales, 6,55 ml de disolución de vitaminas, 0,82 ml de disolución de metales traza 1000X modificada.

35 (ii) *Métodos*

Este experimento se llevó a cabo para monitorizar la formación de isopreno a partir de glucosa al pH (7,0) y la temperatura (34 °C) de fermentación deseados. Se descongeló un vial congelado de la cepa de *E. coli* y se inoculó en un matraz con medio de extracto de levadura-triptona y los antibióticos apropiados. Después de que creciese el inóculo hasta una densidad óptica de 1,0, medida a 550 nm (DO_{550}), se usaron 500 ml para inocular un biorreactor de 15 l y llevar el volumen del tanque inicial a 5 l.

40 El gas de entrada que se usó para mantener la contrapresión del biorreactor en 0,7 bar manométrico y para proporcionar el oxígeno a los organismos de producción a la concentración de oxígeno del 8-10 % en volumen, siendo nitrógeno el resto del gas.

45 Los medios en lotes tenían glucosa en lotes a 9,7 g/l. Se logró inducción añadiendo isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se añadió una inyección de IPTG al tanque para llevar la concentración a 200 μM cuando las células estaban a una DO_{550} de 6. Una vez que se consumió la glucosa por el cultivo, tal como se señaliza mediante un aumento del pH, se alimentó la disolución de alimentación de glucosa para satisfacer las demandas metabólicas a velocidades menores de o iguales a 6 g/min. La fermentación se ejecutó durante suficiente tiempo como para determinar el rendimiento en masa de isopreno máximo sobre glucosa, a total de 68 a 72 h de tiempo de fermentación transcurrido.

55 (iii) *Análisis*

El isopreno es volátil y puede barrerse eficazmente del tanque mediante el gas de entrada. Se determinó el nivel de isopreno en el gas de descarga del biorreactor usando dos espectrómetros de masas, un iSCAN (Hamilton Sundstrand) y un espectrómetro de masas Hiden HPR20 (Hiden Analytical). Se determinaron los niveles de oxígeno, nitrógeno y CO_2 en el gas de descarga mediante las mismas unidades de espec. de masas.

Se mide el oxígeno disuelto en el caldo de fermentación mediante una sonda higiénica, esterilizable con un sensor óptico proporcionado por Hamilton Company.

65 Se determinaron las concentraciones de citrato, glucosa, acetato y mevalonato en el caldo de fermentador en muestras de caldo tomadas a intervalos de 4 horas mediante un análisis de HPLC. Se determinó la concentración en

muestras de caldo mediante comparación la respuesta de índice de refracción frente a una curva de calibración generada previamente usando un patrón de concentración conocida.

(iii) Resultados

5 Se resumen los resultados en la tabla 28. La cepa G11.2 ppc (CMP1237) logró un mayor % rendimiento de isopreno sobre glucosa (figura 48), un mayor % de rendimiento instantáneo de isopreno sobre glucosa (figura 49), un mayor índice de productividad celular (figura 50), una mayor productividad volumétrica global (figura 51), y aproximadamente la misma productividad específica pico (figura 52) de isopreno en comparación con la cepa con promotor ppc de tipo natural (CMP1136).

Tabla 28. Parámetros de productividad de isopreno

Descripción de la cepa / número de ejecución	% de rendimiento instantáneo pico de isopreno sobre glucosa (g/g)	Productividad volumétrica de isopreno global (g/l/h) en el momento de rendimiento de isopreno global máx.	% de rendimiento global máx. de isopreno sobre glucosa (g/g)	CPI (g de isopreno/g de DCW) en el momento de rendimiento de isopreno global máx.	Productividad específica pico (mg de isopreno /l/h/DO)
CMP1237 / 20120407	21,1	2,21	17,4	2,80	31,86
CMP1136 / 20120135	19,7	2,05	16,3	2,43	31,62

15 Ejemplo 40: El constructo G11.2 ppc tiene menos actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa que un promotor ppc de tipo natural

(i) Materiales y métodos

20 Se han recogido células de fermentaciones de 15 l con cepas CMP1237 (promotor ppc modificado por ingeniería genética) y DW719 (de tipo natural ppc) mediante centrifugación. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en tampón de lisis (Tris HCl 50 mM, pH 8, lisozima 1 mg/ml, DTT 1 mM, ADNasa 10 mg/ml, PMSF 1 mM). Se sometieron las células a un ciclo de congelación/descongelación, antes de la centrifugación para retirar los residuos celulares. Se recogió el sobrenadante y se almacenó en hielo.

25 El ensayo monitoriza la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) en oxaloacetato (OAA) mediante acoplamiento de la conversión de OAA en malato por malato deshidrogenasa (MDH) y monitorizando la oxidación de NADH a NAD⁺.

30 El ensayo se llevó a cabo en una placa de microtitulación con los siguientes reactivos: Tris 0,1 M, pH 8, NADH 0,1 mM, KHCO₃ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, PEP 5 mM, Acetil-CoA 0,5 mM, malato deshidrogenasa 5 u/ml, muestra de 10-20 ml. Se observó la disminución de la absorbancia a 340 nm a lo largo de 100 s.

(ii) Resultados

35 Aproximadamente a las 48 h en la fermentación, la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa de DW719 era de 49 actividad/DO₂₆₀ mientras que la actividad de CMP1237 era de 34 actividad/DO₂₆₀.

Ejemplo 41: Construcción de las cepas CMP1189 y CMP1191, que tienen una proteína FNR restaurada, y producción de isopreno por esta última

40 Se preparó un lisado de P1 de la cepa JW1326 de la colección Keio (Baba *et al.* 2006. Mol. Syst. Biol. 2: 2006.0008) y se usó para transducir CMP1133 (expediente interno n.º 40109). Se prepararon lisados de P1 y se usaron según el método descrito en Ausubel, *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. Se seleccionó una colonia sobre LB + kanamicina 10 mg/l y se nombró como CMP1180. Una transducción de P1 es capaz de transducir ADN de hasta 100 kB. Como ynaJ está en estrecha proximidad de FNR (figura 53), la selección de una mutación en ynaJ también llevará con la mayor frecuencia el ADN que codifica FNR de la cepa a partir de la que se produjo el lisado. La colección Keio se ha construido en una cepa K-12, que tiene una FNR funcional. Esto es a diferencia de *E. coli* BL21in que FNR contiene un codón de terminación en la proteína (Studier *et al.* 2009. J. Mol. Biol. 394:653-680). FNR se amplificó a partir de CMP1180 con los cebadores CMP51 (5'-CAG GTA ATG CAT TAC GGC CAA CTG -3') y CMP52 (5'-caggctgtacgctggctgatgac -3') y se secuenció con CMP53 (5'-ATG ATC CCG GAA AAG CGA ATT ATA CG -3'). La secuencia demostró que se había restaurado un alelo de FNR funcional. Se retiró el marcador de kanamicina usando el protocolo recomendado por el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para formar la cepa CMP1189. Se introdujeron los pares de plásmidos pMCM82 (documento US2011/0159557) y pDW72 (véase la solicitud de patente estadounidense n.º: 13/283.564) mediante electroporación y selección sobre

LB + carbenicilina 50 mg/l + espectinomicina 50 mg/l. Las cepas así obtenidas se nombraron como CMP1191.

Se comparó la producción de isopreno por la cepa CMP1191 con CMP1136 usando el protocolo descrito en el ejemplo 38. Como FNR es un sensor de oxígeno, se realizó otro conjunto de matraces de agitación con el mismo medio pero se incubaron los matraces a 50 rpm en vez de a 200 rpm. Eso condujo a un cultivo limitado en oxígeno.

Resultados

El crecimiento de cepa con FNR funcional fue similar al crecimiento de la cepa con FNR mutada en matraz con pocillos aireados (figura 54). Cuando se limitó el oxígeno reduciendo la agitación, el crecimiento de la cepa con FNR funcional fue un poco más lento (figura 55). La productividad específica de CMP1136 (FNR mutada) y CMP1191 (FNR funcional) fue similar en el matraz con pocillos aireados (figura 56). Cuando se limitó el oxígeno reduciendo la agitación, la cepa con la FNR funcional tuvo una productividad específica mejorada (figura 57).

Ejemplo 42: Construcción de MD12-746 (que tiene una mutación de *ackA-pta*)

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contenía los genes *ackA-pta* interrumpidos por un marcador cloranfenicol usando la cepa MG1655 Δ *ackA-pta::Cm* (véase la patente estadounidense n.º 7.745.184, concedida el 29 de junio de 2010) como molde, y los cebadores *ackACF* (5'-gtgcaaattcacaactcagcgg-3') y *ptaCR* (5'-CAC CAA CGT ATC GGG CAT TGC-3'). Se usó el producto de PCR obtenido en una reacción de recombinación tal como recomienda el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para integrar el producto de PCR en el locus de *ackA-pta* en la cepa CMP258 (expediente interno n.º 31588). Se seleccionaron colonias sobre LB + 5 µg/ml de cloranfenicol. Se recogió una colonia y se nombró como MD10-491. Se produjo un lisado de P1 a partir de esta cepa y se usó para transducir CMP1133. Se retiró el marcador cloranfenicol mediante electroporación de pCP20 (Datsenko y Wanner. 2000. PNAS 97:6640-5) en la cepa, selección de dos colonias sobre LB + carbenicilina 50 µg/ml a 30 °C, y luego nueva siembra en estrías de esas colonias sobre una placa de LB a 42 °C. Se seleccionó una colonia sensible a cloranfenicol de esas placas y se nombró como MD12-746.

Se comparó la producción de isopreno por la cepa MD12-746 con DW719 usando el protocolo descrito en el ejemplo 38.

Resultados

Se observó una productividad específica de isopreno aumentada en MD12-746 frente a DW719 (Figuras 58-59).

Ejemplo 43: Productividad específica de isopreno aumentada en una cepa que sobreexpresa *iraM*

Este ejemplo detalla análisis de microalineamientos de fermentaciones de 15 l realizadas mediante el método a continuación.

(i) Métodos

Las cepas usadas en este estudio de transcripción de genoma completo son CMP457 y MCM1020. Se construyó la cepa MCM1020 mediante electroporación de los plásmidos pTrcHis2B (Invitrogen, Carlsbad, CA) y pCL1920 (véase publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2009/0203102) en la cepa CMP258 (véase la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2011/058188) y selección de una colonia sobre LB + espectinomicina 50 mg/l + carbenicilina 50 mg/l.

Se diluyeron rápidamente muestras de fermentación 1:5 en RNALater (Qiagen, Valencia, CA) y se congelaron a -20 °C. Se recogieron las células y se lisaron en Trizol (Invitrogen) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se aislaron los ácidos nucleicos mediante extracción añadiendo cloroformo al 20 % enfriado con hielo. Se mezcló la disolución y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido por centrifugación a 13 000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Se aisló la fase acuosa superior y se añadió un volumen igual de etanol enfriado con hielo. Se aisló ARN usando el minikit RNEasy (Qiagen). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se degradó ADN durante el procedimiento añadiendo una disolución de ADNasa (10 µl de disolución madre de ADNasa I en 70 µl de tampón RDD) (Qiagen) e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eluyó el ARN de la columna de RNEasy en agua libre de nucleasas. Se recogió un mínimo de 20 µg de ARN de cada muestra medida usando un instrumento Nanodrop. Se purificó adicionalmente el ARN mediante precipitación añadiendo un volumen de 1/10 de acetato de sodio 3 M. Se añadió glucógeno (de calidad para ARN de Fermentas) hasta una concentración final de 1 µg/ul seguido por la adición de 2,5 volúmenes de etanol enfriado con hielo. Se incubó la disolución durante 60 minutos a -80 °C y entonces se centrifugó durante 15 minutos a 10 000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento de ARN brevemente con etanol al 70 % enfriado con hielo. Se secó al aire el sedimento de ARN durante 20 minutos y se disolvió en agua libre de nucleasas a una concentración de 1 µg/ml. Se midieron la calidad y concentración usando un instrumento Nanodrop y mediante electroforesis en gel. Se realizaron la síntesis de ADNc, el marcaje y el análisis de transcripción por Roche NimbleGen (Islandia) usando un microalineamiento 385K 4-plex diseñado específicamente para *E. coli* BL21. Se analizaron los datos resultantes usando GenespringGX versión 11

(Agilent).

(ii) Resultados

- 5 Analizando los datos, se halló que se indujo el inhibidor de la proteólisis *iraM* en cepas productoras de isopreno (figura 60).

Ejemplo 44: Construcción de las cepas MD11-610 y MD11-612

10 MD11-610: PL.6 promotor delante de *iraM*. Se generó un producto de PCR (n.º 1) usando los cebadores MQ10-127F (5'-GTT AAC TGG TTG CAG TCA CCT GGA GGC ACC AGG CAC CGC ATC AAC AAA GTT CAT TTG TAA AAA TGG AGA TAA TTG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C-3') y MQ10-127R (5'-TCG TGT CAA TTA CTA TCC ACT TCA TGT TTT TTT ACC TCC TTT GCA CCT TCA TGG TGG TCA GTG CGT CCT GCT GAT GTG CTC AGT ATC ACC GCC AGT GGT ATT TAT GTC AAC ACC GCC AGA GAT AAT TTA TCA CCG CAG ATG GTT ATC TGT ATG
15 TTT TTT ATA TGA ATT CAT ATG AAT ATC CTC CTT A-3') con el plásmido pKD3 (Datsenko y Wanner. 2000. PNAS 97:6640-5) como molde. Se generó el producto de PCR n.º 2 usando los cebadores MQ10-128F (5'-ATG AAG TGG ATA GTA ATT GAC ACG A-3') y MQ11-128R (5'-GCA TTC TTT CAA TAG CTT TGC TTT CTT CAA CGT CTT TTT TGC AAA GGT GGT AAG CAC ATT TTA TTT TCT TAG TCA TTA CTT GAG CCC ATA TGG GCA TAT T-3'), con ADN cromosómico de BL21 (Novagen) como molde. Se usaron los cebadores MQ10-127F y MQ11-128R-term (5'-GCATTCTTTCAATAGCTTTGCTTTCTTCAACGCTTTTTTGC AAAGGTGGTAAGCACA
20 TTTTATTTCTTAGTCAAGTCAAAGCCTCCGGTCGGAGGCTTTTGACTTTACTTTGAG CCCATATGGGCATATT-3') para amplificar un tercer producto de PCR (PCR n.º 3) usando una mezcla de fragmentos de PCR n.º 1 y PCR n.º 2 como molde. El producto de PCR así obtenido se usó en una reacción de recombinación según el protocolo del fabricante (GeneBridges, Heidelberg, Alemania) para integrarlo en un locus de destrucción en la cepa CMP451 (BL21 pgl+ PL.2 mKKDyl G11.2 gltA) para formar la cepa MD11-597. Se retiró el marcador cloranfenicol con pCP20 para formar la cepa MD11-604. Se transformó esta última mediante electroporación con los plásmidos pMCM82 y pDW166. Se aisló una colonia sobre LB+ carbenicilina 50 mg/ml + espectinomicina 50 mg/ml y se nombró como MD11-610.

30 MD11-612: GI1.6 promotor delante de *iraM*. Se generó un producto de PCR (n.º 4) usando los cebadores MQ11-127F (5'-GTT AAC TGG TTG CAG TCA CCT GGA GGC ACC AGG CAC CGC ATC AAC AAA GTT CAT TTG TAA AAA TGG AGA TAA TTG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C-3') y MQ11-129R (5'-TCG TGT CAA TTA CTA TCC ACT TCA TTT TAT ATA CCT CCT GCT ATT TGT TAG TGA ATA AAA GTG GTT GAA TTA TTT GCT CAG GAT GTG GCA TTG TCA AGG GCC ATA TGA ATA TCC TCC TTA-3') con plásmido pKD3 (Datsenko y Wanner. 2000. PNAS 97:6640-5) como molde. Se usaron los cebadores MQ11-127F y MQ11-128R-term para amplificar un nuevo producto de PCR (PCR n.º 5) usando una mezcla de fragmentos de PCR n.º 4 y PCR n.º 2 como molde. El producto de PCR así obtenido se usó en una reacción de recombinación según el protocolo del fabricante (GeneBridges, Heidelberg, Alemania) para integrarlo en el locus de destrucción en la cepa CMP451 para formar la cepa MD11-599. Se retiró el marcador cloranfenicol con pCP20 para formar la cepa MD11-606. Se transformó esta última mediante electroporación con los plásmidos pMCM82 y pDW166. Se aisló una colonia sobre LB+ carbenicilina 50 mg/ml + espectinomicina 50 mg/ml y se nombró como MD11-612.

45 Se sometieron a prueba las cepas MD11-610 y MD11-612 a pequeña escala (matraces de agitación) en comparación con MD1-608 (CMP451 que alberga los plásmidos pMCM82 y pDW166) como control, usando el protocolo descrito en el ejemplo 38 (anteriormente). Todas las cepas tuvieron un perfil de crecimiento similar (figura 61). Las cepas con el promotor *iraM* modificado por ingeniería genética tuvieron una productividad específica aumentada (figura 62).

Ejemplo 45: Productividad específica de isopreno aumentada en una cepa MD11-607, con *acrA* deletado

50 *acrA* es un componente de la bomba de flujo de múltiples fármacos *acrAB*-*ToIC*. Este complejo se ha asociado con resistencia a disolventes, colorantes y detergentes. Intuitivamente, la sobreexpresión de esta bomba podría aumentar la resistencia al estrés por productos químicos tales como butanol o isopreno. Contraintuitivamente, se ha acreditado la mutación de *acrA* con la resistencia a butanol aumentada (Atsumi *et al.*, 2010, Mol Sys Biol., 6:449)

55 Como el isopreno podría tener un efecto tóxico similar al butanol, se sometió a prueba el efecto de la delección de *acrA* sobre la productividad específica de isopreno.

60 Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contenía el gen *acrA* interrumpido por un marcador kanamicina usando la cepa JW0452 de la colección Keio (Baba *et al.* 2006. Mol. Syst. Biol. 2: 2006.0008) como molde, y los cebadores MQ10-121F (5'-GTT CGT GAA TTT ACA GGT GTT AGA TTT AC-3') y MQ10-121R (5'-GTG CAA TCG TAG GAT ATT GCG CCA CCG GC-3'). Se usó el producto de PCR obtenido en una reacción de recombinación tal como recomienda el fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para integrar el producto de PCR en el locus de *acrA* en la cepa CMP451 (véase la solicitud de patente estadounidense n.º: 13/283.564). Se seleccionaron colonias sobre LB + 10 ug/ml de kanamicina. Se recogió una colonia y se nombró como MD11-589. Se retiró el marcador kanamicina mediante electroporación de pCP20 (Datsenko y Wanner. 2000. PNAS 97:6640-5) en la cepa,

selección de dos colonias sobre LB + carbenicilina 50 ug/ml a 30 °C, y luego nueva siembra en estrías de esas colonias sobre una placa de LB a 42 °C. Se seleccionó una colonia KanS de esas placas y se nombró como MD11-602. Se introdujeron los plásmidos pMCM82 (US2011/0159557) y pDW166 mediante electroporación y selección sobre LB + carbenicilina 50 mg/l + espectinomycin 50 mg/l. La cepa así obtenida se nombró como MD11-607.

5 Se sometió a prueba la cepa MD11-607 a pequeña escala (matraces de agitación) en comparación con MD11-608 (CMP451 que alberga los plásmidos pMCM82 y pDW166) como control, usando el protocolo descrito en el ejemplo 38 (anteriormente). El crecimiento fue similar de manera temprana en la fermentación pero el mutante de *acrA* empezó a ralentizarlo más tarde en la fermentación (figura 68). MD11-607 tuvo una productividad específica
10 aumentada en comparación con MD11-608 (figura 69).

Secuencias

mvaE de *L. grayi*:

atggtaaagacattgtaataattgatgccctccgactcccatcggttaagfaccgcggtcagctctcaagatgacggcggaggaaftgggaaccgcagttacaaggct
ctgttcgagaagaacgaccaggtcaagaccatgtagaacaagtcattttggcaacggtttacagcagggaacggccagaatcccgccgcagatcgcccttaattc
tggcctgtccgcagagataccggctcactaataaccaggtgtgtggtctggcctgaaagcaataagcatggcgcgccaacagatcctactcggagaagcgggaagta
atagtagcaggaggtatcgaatccatgacgaatgcgccgagtattacattataataaagaagaagacacctctcaaacctgttctacgatgacctcgaatgctga
ccgacgcgtttagcggaaagattatgggttaacagccgaaaatgttccgaacagtagcgcgtatcagtgaggcccaggacgcccttgcgtatggatcgagatgaa
agcagcaaaaggccaagaacagggcatttgcagctgaaatactgcctctgaaataggggacgaagtattactcaggacgaggggggtcgtcaagagaccacct
cgaaaaattaagtctgcttcgaccatttttaagaagatggtactgttacagcgggcaacgcctcaacgatcaatgatggcgcctcagccgtgatcattgcatcaaggga
gtttgctgagacaaaccagattccctacttgcgctgacatgatattacagagatagggcattgatccatcaataatgggcattgctcccgtgagtgcatcaataaactga
tcgctgtaaccaaaattagcatggaagaaatcgtatctttgaaataatgagcatttgcagcatcctcgggtgtagtcaaaaagagtttaagcattcccgatgaaaagatc
aataattggcgggtccggattgcactagccactcttggcgcaccagagcgcgcattgtaaccacctagcgcaccagtgaaacgtacacacggagcgtatggtat
tgctccctgtgcaattggcgggtggccttggcctagcaataataagaagtgcctcagggaagatcagccgggttaaaaaatttataaattggcccgtgaggaccgtctgct
agactcaggagcaagccgtgatcagcccagctacaaaacatgactggcagaatgacactctcgaagataatgccgacaatctgatcgaatacaaatatctgaaat
ggaaatccctcttgggtgtgcttgaatctgagggtaaatgataagattatccatccactagcaactgaggaaccgagtgaatcgcctgtaataatggtgcaaaa
atggcaaacaccctggcggtttcagtcagaatlaaaagatggttctcgtgggcaaatgacttatgaacgtcaagaacccgcaactatcgagcatalcagcagc
gcagagaaaagcggcaattttcgtccgcagcgcagtcacatccatcattgtgaaacgaggtgggggtctaaaagagatagtagtgcgtacgttcgatgatccga
cgttctgtctattgatctgatagttgatactaaagacgcaatggcgcgtaacatcalttaacaccaltctcaggggtgtagccggcttctgagggaatccttaccgaagaa
attctgttctctattatcattacgaaccgaatcaattgtgaccgcagctgtcgcataccttacgaagcactgagtaaaaagggtgatgtaaacgaatcgtgaaaaa
gtggctgctgcatctaaattgccagttagatccitacgagctgaaccacaacaaggtattatgaatggtattgagccgctgtttggcctcaggaaatgacacac
ggcggtcgcggcagccgacatgcgtatgctcagcgcgatcagcactatcggggcttaagccagtggtgaggttcagaagggcgcgttacacggggagatcagctca
ccactgcactcggcagcgttggcgggtgcaattgaggtcttgcctaaagcgaagcggcattcgaatcatggggatcacagaggcgaaggagctggcagaatcac
agctcggtagggctggcgcaaacctggcggcgttaagagcgtttagtgaaggaalacagcaaggtcacatgctgctccaggctcgtctcttgcattatcggtag
gtgctacaggcaaggaagtgaatcctggccgaaaaattacaggcctcgtatgaatcagcgaacgctcagaccatctcgcagagatcagatcgcaaaaagtga
15 attgtga **SEQ ID NO:1**

mvaS de *L. grayi*:

atgacatgaacgttgaaticgataaaatgcaattctttgtccaccttacttttgacatgactgatctggcagtagcacgggatgcatccaataagttctgattggat
 tggcaggaccagatggcagftaatccgaaaacgcaggafattgacattgccacaaatgctccaaaaacatactgtagctgaggaccttgataaaattgatatggt
 catagtcggcaccgagagtggaaicgatgaatcaaagcagtgccgtagtgtctcacaggltgctcgggtatccagaagttgctcgtctttgaaatcaaaagaacctg
 ttatgggggtaccgcgctttacagtcgctgtaaacacattaggaatcatcctgaatcaaaggtctgtagtgcacagatagcgcgaaatacggcctggcttctggag
 gtgaaccaacgcaaggtgcaggcgtgtgctatgctgctcaactgacctaaatgattgttcaacgacgatagcctcgcgcttacacaagatatctgactctg
 gcgaccagttggacatgactatcctatggtcgcggcctcttagtacagagacctacatccagtcattcagaccgatggcaggaaatacacaacggctgcagcatg
 cactggcagactttgctgcccttagctttcalatcccgtatacaaaaaggcaaaaaggcgtgcttgaacatctgaaggcaatcagaggagctcagaaccgtatac
 tagcaaaatagaaaagglatagcctactccagaaggcgggtaacctgtataccggtagcctgtatctaggacttattcacttctggaaaatgcagaagacctaaagc
 tgggtatttaataggcctctttcttacggttccgggtgctgttgcggagttttctcaggaaggcgtgttgaggactatcaggaacagctactaaacaaaacatgccgaaca
 gctggccatagaaaagcaactgacaatcaggagtagcaaacgatgttctccgacgcttgacgtggacaagacgccgaatacgaagacacattagcttatagcatt
 ctgtagctcgaacacgcgtacgtgagtagaggattga **SEQ ID NO:2**

5 *mvaE de E. faecium:*
 atgaaagaagtgggtatgattgatcggctcgcacaccattgggaaatacagaggtagctcttagcttttacagcggtgaggctggggacactggtcacgaaagggt
 gctggataaaacaaagcttaagaagacagatagaccaagtatactggcaatgctctcaggcaggaaacggacaaaactgttcaagacaaatagccctgaacag
 tggcttaccagttgacgtgccggcgtgactaltaacgaagttgcgggtccggaatgaaagcgggtatttagcccgcagtaatacagttaggggagggcagagttgg
 tcatgtaggggtgacggagcaatgtcacagcaccatgctgaaacctaccagtcagagaccaacgaatacggagagccgatcatcaatggttaatgacggggt
 gacggatgctgttccaatgctcacatgggtcttactgccgaaaaggtggcgaccagttttagtgcgcgcgaggaacaagaccgggtacgattgctcagccaattga
 aagcagcgcacgctgtaagccgggggttctcagaagagattatccggtaagattagcgcagaggatgctttagtgaagacaggcagtaagaggcaacagc
 actttggaaaaactgggcacctgctggcaggtgtttctgaagaggccacggttaccgctggcaatgcttaccgctgaatgacggcgtagtgctgattctgcatca
 aagaatacgcgaaaacaataatctgcttacctggcgacgataaaggaggtgctggaagttggtatcgalcttctatcatgggtattgccccataaaggccattcaa
 aagtaacagatcgtctgggcatgaacctgtccagattgatctgtcgaatfaatgaagcattcgcggcatctagcattgttctcaagagctgcaattggacgaaga
 aaaagtgaatatctatggcggggcgtatgctttaggcatccaatcggcgcaagcggagcccggatactgacaaccttagcatacggcctctgctgagcaaaagcg
 ttatggtattgctcattatgatcggcgggtgctgtgctgcccgtgctgttagaagcgaatgtagcagaccacaagacgctcagaagaaaaagtttaccagctta
 cccctccgagcggagatcgcagcttatcgagaagaacgttctgactcaagaacggcacttatttccaggagcagacgttgcgaagaactgtccgatcacatgatt
 gagaatcaggctcctgaagtggaaattcgaatggcaaaaattttagatfaatgcaagaaaaatggattcctatgctgactgaagaacctcagtaatacgcg
 gcagcatcgaacggcgcaaaaatctcgggaacattgctcgggaacgcccagcggcctatgctcggggcagattgtctctggcaaatcagaatacaagccgtg
 ataaatgccgtgaatcatcgaagaagaactgattcttgcgcaaacgagtcgacctgagattgttaaacgcgggggaggtgtcagatattctacggggagttta
 tgggtctttcaccgctattatcaatcgaattctggtggagtcgaagcgaatggggcaaacatgatcaactctattctcgaagcgttgcataaaactgctggaat
 ggttcccggagaggaaactgttctccatcctgtcaaaactcgtacggagtcctggcatctgcatgttgcgagattcctttgaaagactgtgctgaacaaagaaatt
 ggtgaacagatcccaagaaaattcaacagcagggaatagctaaactgaccttaccgcgcggcaaccataacaaggggattatgaacggatcgaagccgtc
 gttgccgaacgggaaacgacacacgggctgttccgcttattcacgcatacggcggcgtaatgcttgaaccaaggttaacggattggcagatcaagggcgataa
 actggttgaataatacagctccactggctgtgctgactgctggtgctgctgaacataattacaaaagccaagcttccctcgcctatgctgatattgattccgaaa
 agaactggcccaagtatcggcggtaggttagcacagaatctggcggcttacgtcatttagtagacagaaggcattcagaagggacacatggccttgcagacg
 ttcttagcatttcgataggtgccatcggtaggagatagagcaagtcgcgaaaaactgctggaagctgaaaaaatgaatcagcaaacggcaatagatttagaaa
 aaattcgcgagaaatga **SEQ ID NO:3**

mvaS de E. faecium:

atgaaaatcggattgaccgtctgtcctctcatcccgaatttgatttgacatgactgagctggcagaatcacggggatgatccagctaaatcatattggaatcggg
 caagatcagatggcagtgatcgcgcaaacgaggacatcataactgggtgcaaacgctgcgagtaagatcgtgacagagaaagaccgcgagtgattgatatgga
 atcgttggcacggaatcaggaaatgaccactccaagcaagegccgtgattatccatctccttaaaatcagtcgtccgctcttcgaggtaaaagaaactgtgta
 tggcggaaactgctccctgcacatggcgaaggatgtcaaaaatcatccggagcgtaaaggcttggtaattgctcagacatcgcgcgffatgfttggccagcggg
 ggagaagtactcaaggcgtggggccgtagccatgatgattacacaaaacccggattcttcgattgaagacgatagtgftttctcagagagatctatgattctg
 gcggcctgattactccgagttccctgtagtggacggcccttcaaaccaacgtatatagagagtttcagaaaagttggaaccggcacaaggaaatgtccggaagag
 ggctggaagattatcaagctattgtttcacataccctatagcaagatgggtaagaaagcgtccagagtgfttagaccaaacgatgaagataaccaggagcgttaa
 tggctagatagaggagtctattcgtatagccggagaattgtaacctgtacacaggcagctgtacctgtgtcttacaagctgttgaaaactctaaaagttacaaccg
 ggagatcggatcggcctctttctatggcagtggtgctggtgctccgagttcttaccgggtatttagaagaaaattaccagagtacctgttcgctcaagccatcaagaat
 gctggatagccggactcggattacggcgtgatgaatacagaccatcttccagagactctccagaacatggtgaatgcgccgaatatacagcgcacgtcccttctat
 aaccaagattgagaacgacattcgtattataaaatctga **SEQ ID NO:4**

5 *mvaE* de *E. gallinarum*:
 atggaagaagtggtaattatagatgcacgtcggactccgattggtaaatcacgggtcgtggaagaagtttcagcgggtggcgtggggaccggccgtggctaaagacat
 gttcgaacgcaccagaaaatcaagaggagatcgcgcaggtcataattggtaatgtcttcagcaggaatggccagaaccccgcgcggcaagttgctcttcaatc
 agggttgtccgtgacattcccgttctacaaltaacgaggttgggtctggttgaagctatcttgatgggcatggaacaaatccaactcggcaaagcgaagtagtg
 ctggcagcggcattgaatcaatgacaatgcgcaagcctgtcccataacaagcggaggatagctatagtgctccagtgctgagcatgacactggatgctgta
 cagacgcatfttctagfaaacctatgggattaacagcggaaaacgtcgcacagcgtacggatctcccgtgagggcgaagatcaattcgcataatcaatctcagatgaaa
 gcagcaaaagcgcaggcagaaaacaaatcgttaaggaatgtgccaactggcgggtgaaactaaaaccatcacagctgacgaaggatcagatcccaacaacgat
 ggagaactgcaagtcacaacctgtttttaaaccgatggcactgtaaccgagggaatgctagcaccatfaatgacggggccccccttgtctgcttctagcaaaa
 ctactgcgaaactaatgacataccgtacctgcgacaatcaagaaattgtgaagttggaatcgtaccggagattatggcactctccgataaaagcgafacaacatt
 gttacaaaatcaaaaagttgactcgaagatattggagttttgaaataaatgaagccttggccgcaagtagcatagtggtgaaatcgtagttgggattagatccggctaaag
 ttaaccgttatgggggtggtatattcttaggtcatgcaattggggcaaccggcgtcgcctggccacttactgggtgatcaaatgcaggagatacaagcacgttatggtat
 tgcgagcctgtgctgtggtggtgactgactggcaatgcttttagaacgtccaactattgagaagcctaaccgacagacaaaagttctatgaattgtcaccagctga
 acggttgaagagctgaaaatcaacagaaaatcagttctgaaactaaacagcagttatctcagatgatgcttggcaggacactgcaaacattgatagaaaatcaaat
 atcagagattgaaccccaatggcgtcgggatgaacctgaaggtgatgggaaagcctatgttgcctaatggcgacggaagagccgtccgtatcgcggccatgct
 aatggtgccaaaatggccggcgaattcacactcagtcgaaagaacggctgctcagagtcagattgtttcagcgcgaagaatccgaatgaaatcgaacagagaata
 gctgagaaccaagcttgatttccgaacgtccgaacagtcctatcttcactgtgaaaagagaggaggtctccgccgacttgcacttctccttctccgattctca
 gcaggagtctcggaccagtcacattttatcagtgaccctttttagatgtgaaagacgcgatggggcacaatatcaaaatgcaactttagggcgtcgcagccct
 gtttccgcaatggttcccgaatgaggaaaatcttttctattctcgaacttggttacggagagcttagtcacggctgttgtgaaagcctttagtgcacttagcaagaga
 ggtggtgcaacggtggccagaaaatgtgcagcgtcgtcttcgcaagacagaccataaccgcgcagtgaccacaacaaaggattatgaacgggtgtagagcc
 tttatgcttggcacaggcaacgacacgcgcgagtcagccgttgcattggatagcagcgcgcaccggtagctatcagggtctgactaactggacgattgagtcg
 gatcgcctgtaggcgagataaacctgccgctgccaatcgtacagttggagcgtctaccaagtggtgccaagctcaagcggcactggagattagtgatgttact
 ctctcaagagcttgcagccttagcggcgtcagtaggttttagtacaataatcgcggccctgcgcgactggttccgaaggtatcaaaaaggacatgtccatgcaa
 gccccgtctctcgaatcgcggctggtgctgaaaagccgagatcagcaggtcggcaaaagttggcgcagaacccgcaatgaatcagcagcagcgcctccgttt
 tcttggcagatccgcgaacatga **SEQ ID NO:5**

mvaS de *E. gallinarum*:

atgaacgtcggcattgacaaaftaatttttctgtccaccgtatfatctggatattggtcgcacctggcccacgcacgcgaagtggacccgaacaaftfacaattggaattgg
 acaggatcagatggctgtgagcaaaaagacgcacgafatcgaacattcgcggctagtccgcgaaggaaftttagaacctgaggacttgaagctatagacatggtt
 atagttggfaccgaatcgggcaatgacgagagcaaaagcatccggctgttttacctgtttgtggcgtacaaccttctgctgcagtttgaaltaaagaagcctgta
 cggggcaaccgcagcattcagttgccaagactatatacaagcgaaccggagagcaaggtcctggaaltgcaagcgaatagctcggatggtcttcggtcaggt
 ggagagccacacaagcgcaggggcagttgctatgcttctcaccgcaaatcccagaatctgaccttgcgaaacgacaatctgatgtaacgcagatattatgactt
 ctggagaccacttggtcacgcttaccctatgtagatggccaccttccaatcaagtctatattgacagtttaagaaggtctggcaagcacttgcgaacgcaatcaagctt
 ctatatccgactatgcccgattagtttctatattccgtatacaaaaatgggtaagaagccctgctcgtctgttttgcagatgaagtggaaactgaacggaacgcgttatg
 gcacggatgaagagctatcgtatattcacccggatcggcaactgtataccgggatcattgacctggggctgatatccttattgaaaacagttctcactctcggcgg
 gcgaccggatagattgtttagttatggagtgccgctgacgcgaatttttccggctgtttagtgccaggtatgaaaatcaattgacaaaagagggcgaaccagct
 cctggtacagctcagaagcttccatcgaagagatgagggcattttacagattcctagaatgatcaggtgacgcgttctggatgacctgccatattccatccgcg
 agataaaaaacacgattcgtactataaggagagctga **SEQ ID NO:6**

5 *mvaE* de *E. casseliflavus*:
 atggaagaagtgtcatcattgacgcactgctactccaatagaaagfaccacggctcgtgaaagattacacagctgtgaaactggggacagtagcagcaaaggcgtt
 gctggcacgaaatcagcaagcaaaaagaacacatagcgaagtattattggcaacgtctcgaagccggaagtggcagaatccagggcacaagttagttacagct
 aggattgtctctgatatccccctagcagatcaatgaagtgtgtgctcgggtatgaaagcattctgatgggtatggagcaaatcagctgaacaaagcctctgtggtc
 ttaacagcgggaattgaaagcatgaccaacgcgccgctgtttagttattacaacaagcgtgagatcaatattcggcggcggtagcacaatgatgcacgatgtctaac
 agatgctttcagttccaaccaatgggcttaaccgcagagaccgtcgtgagagatatggaattacgcgtaaggaaacaagatgaattgcttactctcaaatgaaggc
 ggcaaaagcccaggcggcgaaaaagttagatcaggaaattgtacctcagcgaaaaaatccggaacggtttccaggacgaaggcagcagaccgcgacaacagtc
 gagaagctagctgagcttaaacgggtgtcaaaaagacggaacagttacagcgggtaaacgctctacgataaatgatggcgtgctatggtattaatagatcaaaaatc
 tattgcgaagaacaccagattccttactgtgccgttataaaggagatcgttaggtgggttttccccgaaataatgggtatttccccatlaaggctatagacacctgct
 gaaaaatcaagcactgacctagagatagatagaatattgagatfaatgaagccttctgctcgaagctcattgtgtagaacgcgagttggcctggaccccaaaaagt
 taatcctatggcgtggtatatacactggccacgcaattggggcgcgggagctcgcattgcgacgaccggtcttatcagctgaaagataccaggagcgtctacggt
 atagcttcttatgctgtgtggggctgtgattggcgtatgcttggaaaaccatcggccactgctcacaactaattttgatgaggaatctgctccgaaaaactga
 gaagaagaagtttatgcttagctcctaacgaacgcttagcgttttggaaagcccaagcgcgtattaccgctgctgaaacctggtctccaggagatgaccttaacaa
 agagacagccaatcactaatacgaacccaatcagcgaagtgaattcctttaggcgtggcctgaacttacaggtgaatggaaagcgtataatgttctctggccac
 ggaggaaccgtccgttatcgtcgtgatgcgaatggcgcgaatggctgtcctattacaacaagaatcagagagagcgtttacggggtcagattgtctcatggacg
 tacaggaccagaagcaatattagcgaagttgaatccgagcaagctaccatttccgggtggcaaatgaaacataccgctctatcgtgaaaagaggagaggtctgcg
 tagaglcattggcaggaallcagtcggccgaaagtgacttagccacggcglatgtalcaattgacctgatgglagatglaagatgcaatgggtgctlaatalcalcaat
 agtatcctagaaggtgttgcggaattgttagaaaatggtccagaagaagaatectgttctcaattctccaatctcgcgacagaaagctggtaacggcgcagctgct
 cagttccgttgataaattgtccaaaactgggaatgctgacaagtagctgtaaaatagtcacgcggcggacttgcgtaagatagatccatacagagctgccacacaca
 ataaaggtattatgaatggcgttgaagcgttaatcttagccaccggaatgacaccgctcgggtcggctgcatgccacggttacgcggcacgcaatggcggaatgca
 aggcttacctctggacgattatcgaagatcggctgatagctctatcacattaccttggctattgcacagtggggggtccacaaaaatcttccaaaagcacaggc
 cgccctggcgtactgctgttagacggcgtcggaaactggccagcctggcggcagtggtgggattagttcaaaatttggccgctttacgagcactagtgagcagggg
 cattcagcaagggcacatgagatgcaagctagatccctggccattagcgtaggtgcgaaaggtactgaaatagagcaactagctgcgaagctgagggcagcgcgac
 aatgaatcagagcagcgtcgtaaattctgaccgaaataagaattaa **SEQ ID NO:7**

mvaS de *E. casseliflavus*:

atgaacgttgaattgataaaatcaatftttcgtfccgccctatttcattgatatggtggatctcgtcatgcaagagaagftgacccaacaagttcactataggaataggcc
 aagatcagatggcagtaacaagaacgcaagatcgtaacgttcgcgatgcacgccgcgaagatattctgactaaggagatttacaggccatagatatgtaat
 agtggggactgagctgggacgacgagagcaaggcaagtgcgtcgtattgcatcggctfttaggtattcagccttttgcgctcctttgaaftaaggagcatgctat
 ggggccactgccggcctcagtttgcaaaagctcatgtcagcgttaatccccagagcaaggtcctgggtgtagctccgatatagcacgctacggactggcatccggag
 gagaaccgactcaaggtgtaggtgctgtggcaatgttgattccgctgatccagctatcttgcagttagaaaatgataatctcatgttgaccaagatatacatttttgc
 gcccggtcgggcatcaatatcctatggtagacggccatctgtctaattgcctctatataagacagctttaaacaagcttgcaagcacattgcgagaaaaaacaggact
 gctaaagattatgctgcattgtcgtccatattccgtacacgaaatgggtaagaagctctgttagcggtttttgcggaggaagatgagacagaacaaaaagggttaatgg
 cacgttatgaagaatcaattgtatacagctgctggactggaatctgtatactggctcactctatctggcctgatttccctactggagaatagtagcagttacagcgaacg
 atcgcataggtctgttagctatggttcaggggcgttgcggaattttcagtgcccttggtagccgggttacgagaacaattagcgaagctgccatcaagctctctg
 gacgaccggcaaaactgactatgcagagtagaagccatgttaatgaaaccattgatattgatcaggaccagtcattgaggatgactfactgtactccatcagagag
 atcaaaaactattcgtactataacgaggagaatgaataa **SEQ ID NO:8**

5 *mvaE de E. faecalis:*

atgaaaacagtagtattatgatgcaaffaacaccaattgaaaaataaaggcagcttaagtaagtaagtccgtgacttaggaacacatgttacaacacaactftt
 aaaaagacattccactatttctgaagaaatgatcaagtaattttgaaatgtttacaagctgaaatggccaaaatcccgcacgacaatagcaataaacagcggttgt
 ctcataaattcccgaatgacggtaafgaggtctgcggatcaggaaatgaaggccgttattttgcgaaacaattgatcaatlaggagaagcggaaagtttaattgctgg
 cgggattgagaatgtcccaagcacctaaatfacacgttttaattacgaaacagaagctacgatgcgccttttctagatgatgatgattaacggatgccttagt
 ggtcagcgaatgggcttaactgctgaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagcaagatcaattttctgtacattcacaftaaaagcagctcaagcaca
 gcagaaggatattcgtgacgaaatagcccattagaaatcaggaacgctgtgtgagaagaatgaaggatcgccttaattcagcgttgagaagctlaggaacg
 cttaaacagtttttaagaagacggfactgtaacagcagggaatgcatcaaccattatgatggggcttctgtttgattattgcttcacaagaatagccgaagcacacgg
 tcttcttatttagctattatcagacagfgtggaagtcggattgatccagcctatatgggaattcggcattaaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaactacta
 cggagaagaatgatctgatgaaatcaacgaagcattgcagcaactcaatcgtggtcacaagagaactggctttaccagaggaaggtcaacatttatggtggcggta
 tttcattaggtcatgctgattgggtccacaggtgctcgttttaaacgagttfaagttatcaatfaaatcaaaaagaaaagaatagtagtgcttctttatgtatcggcgtgg
 cttagactcgtatgctactagagacactcagcaaaaaaacagccgattttatcaaatgagctctgaggaacgcctggcttcttcttaatgaagccagatttctg
 ctgatacaaaaaaagaattgaaaatagcgtttatcttcagagattgccaatcatatgattgaaaatcaaatcagtgaaacagaagtggcgtatggcgttgcttacttta
 acagtgacgaaactgattattgttaccatggcgacagaagagccctcagttattgcggctttgagtaattgggcaaaaatagcacaaggatttaaacagtgatcaa
 caacgcttaatcgtgacaaactgtttttacgatgttcagatcccagtcattgattgataaactacaagtaagagaagcggaaagttttcaaacagcagagtttaagttat
 ccactatcgtfaaacggggcggcggcttaagagattgcaatcgtacttttgatgaatcattgtatctgctgactttttagtagatgtaaggatgcaatgggggcaaatat
 cgttaacgctatgttggaaggtgtggccgagttgtccgtaaggtttcggagcaaaagattttatcagatttttaagtaattatgccacggagtcgggtgttacgatgaaa
 acggctattccagttcacgttaagtaagggagcaatggccgggaaattgctgaaaaaattgttttagcttcacgctatgcttcattagatcctatcggcagtcacgcat
 acaaaaggaatcatgaatggcattgaagctgtagtttagctacagaaatgatacacgcgctgttagcgttcttctcatgcttttgcgggtgaaggaaggtcgtaccaag
 gcttgactagttggacgctggatggcgaacaactaattggtgaafttcagttccgcttgccttagccacggttggcgtgcccacaagctttacctaactcaagcagct
 gctgattgttagcagtgacggatgcaaaagaactaagtcgagtagtagcggctgtgttggcacaanaatttagcggcgttacggcccttagtctctgaaggaattcaaa
 aaggacacatgctctacaagcagcttcttagcagtagcggctggagctactgtaagaaggttagggcagtcgctcaacaftaaacgtaaaaaacgatgaacca
 agaccgacctgctatttttaaatgatttaagaaaacaataa **SEQ ID NO:9**

mvaS de E. faecalis:

10

Atgacaattgggattgataaattagtttttggcccccttattatattgatatgacggcactggctgaagccagaatgtagacctggaaaattcatattggtattggcg
 aagaccaaatggcggtgaaccaatcagccaagatattgacattgagccaatgccgcagaagcgaatctgaccaagaagataaagagccattgatattggtgat
 tgcgggactgagtcagatcagatgagcfaaaagcggcgcagttgtctacatggttaattgggattcaaccttctgctgctcttcaaatcaaggaagctgttacg
 gagcaacagcaggcttacagttagctaaatcacgtagccttacatccagataaaaaagcttggctgtagcggcagatattgcaaatatggcftaaattctggcggtg
 agcctacacaaggagctggggcggtgcaatgtagttgctagtaaccgcgcaatltggcftaaagaggataatgtgatgctgacgaagatattgacttttggcg
 tccaacagccaccgtagctatgctgtaggtcttggcaaacgaaacctacatccaatcttggcccaagctgggatgaacataaaaaacgaaccggtctgattttg
 cagattatgattgctttagcgtccatattctacacaaaaatgggcaaaaaagccttattagcaaaaatctccgacaaactgaagcagaacaggaacgaattttgccccg
 ttatgaagaaagatcgtctatagctgctgctgtagaaactgtataccggttactttatctgggactcatttcccttttagaaaatgcaacgactttaaccgagccaatcaa
 attggtttattcagttatggttctgctgctgctgcaatlttactggtgaatttagctggttatcaaatcattacaaaaaagaactcatttagcactgctggataatcgga
cagaactttctatcgtgaatgaagccattgttcagaacttttagacacagacattgatcaaacgtagaagatgaatnaaatatgatttctgctattanaataac
cgctgcttattcgaactaa SEQ ID NO:10

5 *E. gallinarum* EG2 (mvaE):

MEEVVIIDARRTPIGKYHGSLLKFSVAVALGTAVAKDMFERNQRIKEEIAQVIIGNVLQAGNGQNPARQVA
 LQSGLSVDIPASTINEVCGSGLKAILMGMEQIQLGKAQVVLGAGGIESMTNAPSLSHYNKAEDTYSVPVSS
 MTLDGLTDAFSSKPMGLTAENVAQRYGISREAOQDFAYQSOMKAAKAQAKENKFAKEIVPLAGETKTIAD
 EGIRSQITMEKSLKPFVKTDGTVTAGNASTINDGAALVLLASKTYCETNDIPYLATIKEIVEVGIDPE
 IMGISPIKAIQTLLQNKVSLIEDIGVFEINEAFAASSIVVESELGLDPAKVNRYGGGISLGHAIIGATGAR
 LATS LVYQMQEIQARYGIASLCVGGGLGLAMLLEPRTIEKAKPTDKKFYELSPAERLQELNQQKISSET
 KQQLSOMMLAEDTANHLIENQISEIELPMGVGMNLKVDGKAYVVPMAATEPSVIAAMSNGAKMAGEIHTQ
 SKERLLRGQIVFSKPNPNEIEQRIENQALIFERAEQSYPSIVKREGGLRRIALRHFPADSQQESADQST
 FLSVDLFDVVKDAMGANIINAILEGVAALFREWFPEEILFSLSNLATESLVTAVCEVPPSALS KRGGGA
 TVAQKIVQASLFAKTDPRVAVTHNKGIMNGVEAVMLATGNDTRAVSAACHGYAARTGSYQGLTNWTIESD
 RLVGEITLPLAIATVGGATKVLPKAQAALISDVHSSQELAAALASVGLVQNLALRALVSEGIQKGHMS
 MQARSLAIAVGAEKAEIEQVAEKLQRNPPMNQQALREFLGEIREQ **SEQ ID NO:11**

10 *E. gallinarum* EG2 (mvaS)

MNVGIDKINFFVPPYYLDMVDLAHAREVDPNKFTIGIGQDQMAVSKKTHDIVTFAASAKEILEPEDLQA
 IDMVIVGTESGIDESKASAVVLRLLGVQPFFARSFEIKEACYGATAGIQFAKTHIQANPESKVLVIASDI
 ARYGLRSGGEPYQAGAVAMLLTANPRILTFENDNLMLTQDIYDFWRPLGHAYPMVDGHLNQQVYIDSFK
 KVVQAHACERNOASISDYAASIFHPIPYTKMGKALLAVFADEVETEQRVMARYEESIVYSRRIGNLYTGS
 LYGLLSLLENSHLSAGDRIGLFSYSGAVSEFFSGRLVAGYENQLNKEAHTQLLDQRQKLSIEEYEA
 FTDSEIDQDAFSDLLPYSIREIKNTIRYKES **SEQ ID NO:12**

L. grayi (mvaE):

MVKDIVIIDALRTPIGKYRQGLSKMTAVELGTAVTKALFEKNDQVKDHVEQVIFGNVLQAGNGQNPARQI
 ALNSGLSAEIPASTINQVCGSGLKAI SMARQOILLGAEVIVAGGIESMTNAPSIYYNKEEDTLKPVV
 TMTFDGLTDAFSGKIMGLTAENVAEQYGSREAOQDFAYQSOMKAAKAQEQGIFAAEILPLEIGDEVITQ
 DEGVRQETTLEKLSLLRTIFKEDGTVTAGNASTINDGASAVIASKEFAETNQIPYLAIIVHDITEIGIDP
 SIMGIAPVSAINKLIDRNQISMEIDLFEINEAFAASSVVVQKELSI PDEKINIGGSGIALGHPLGATGA
 RIVTTLAHLQKRTHGRYGIASLCIGGGLGLAILIEVPQEDQPVKKFYQLAREDRLARLQEQAVIS PATKH
 VLAEMTLPEIDIANLNIENQISEMIEPLGVALNLRVNDKSYTIPLATEEPSVIAACNNGAKMANHLGGFQS
 ELKDGFLRGQIVLMNVKEPATIEHTITAERAAIFRAAAQSHPSIVKRGGLKEIVVRTFDDPTFLSIDL
 IVDIKDAMGANIINTILEGVAGFLREILTEEILFSLSNYATESIVTASCRIPYEALSKKGDGKRIAEKV
 AAASKFAQLDPYRAATHNKGIMNGIEAVVLASGNDTRAVAAAHAHAYASRDQHYRGLSQWQVAEGALHGEI
 SLPLALGVSVGAIEVLPKAKAAFEIMGITEAKELAEVTAAVGLAQNLAALRALVSEGIQKGHMSLQARSL
 ALSVGATGKEVEILAELKQSRMNQANAQTILAEIRSQKVEL **SEQ ID NO:13**

15 *L. grayi* (mvas):

MTMNVGIDKMSFFVPPYFVDMTDLAVARDVDPNKFLIGIGQDQMAVNPKTQDIVTFATNAAKNILSAEDL
 DKIDMVIVGTESGIDESKASAVVLRLLGIQKFARSFEIKEACYGGTAAALQFVAVNHIRNHPESKVLVVAS
 DIAKYGLASAGEPYQAGAVAMLVSTDPKIIFANDDSLALTQDIYDFWRPVGHDYPMVDGFLSTETYIQS
 FQTVWQEYTRKSQHALADFAALSFIHPIPYTKMGKALLAILEGESEEAQNRILAKYEKSIAYSRRKAGNLYT
 GSYLGLISLLENAEDLKAGDLIGLFSYSGAVAEFFSGRLVEDYQEQLLKTKHAEQLAHRKQLTIEEYE
 TMSDRDLVDKDAEYEDTLAYSISVVRNTVREYRS **SEQ ID NO:14**

20 *E. faecium* (mvaE):

MKEVVMIDAARTPIGKYRGSLSPTAVELGTLVTKGLLDKTKLKKDKIDQVIFGNVLQAGNGQNVARQIA
LNSGLPVDVPAMTINEVCGSGMKAVILARQLIQLGEAELVIAGGTESMSQAPMLKPYQSETNEYGEPSS
MVNDGLTDAFSAHMGMLTAEKVATQFVSREEQDRYALSSQLKAAHVAEAGVFSEEIIPVKISDEEDVLSE
DEAVRGNSTLEKGLTLRTVFSEEGTVTAGNASPLNDGASVVLASKEYAENNNLPYLATIKEVAEVDGDP

SIMGIAPIKAIQKLTDRSGMNLSTIDLFEINEAFAASSIVVSQELQLDEEKVNIYGGAIALGHPIGASGA
RILTLAYGLLREQKRYGIASLCIGGGGLGLAVLLEANMEQTHKDVQKRFYQLTPSERRSQLIEKNVLTQ
ETALIFQEOTLSEELSDHMIENQVSEVEIPMGIAQNFQINGKKKWIPIATEEPSVIAAASNGAKICGNIC
AETPQRLMRGQIVLSGKSEYQAVINAVNHRKEELILCANESYPSIVKRGGGVQDISTREFMGSFHAYLSI
DFLVDVKDAMGANMINSILESVANKLREWFPEEEILFSILSNFATESLASACCEIPFERLGRNKEIGEQI
AKKIQQAGEYAKLDPYRAATHNKGIMNGIEAVVAATGNDTRAVSASIHAYAARNGLYQGLTDWQIKGDKL
VGKLTVP LAVATVGGASNILPKAKASLAMLDDISAKELAQVIAAVGLAQNLAALRALVTEGIQKGMGLQ
ARSLAISIGAIGEEIEQVAKKLEAEKMNQQTAIQILEKIREK **SEQ ID NO:15**

5 *E. faecium* (mvaS)

MKIGIDRLSFFIPNLYLDMTELAESRGDDPAKYHIGIGQDQMAVNRANEDIITLGANAASKIVTEKDREL
IDMVIQVTESGIDHASKASAVIIHLLKIQSFARSEFVKEACYGGTAALHMAKEYVKNHPRKVLVIASDI
ARYGLASGGVEYQGVAVAMMITQNPRIILSIEDDSVFLTEDIYDFWRPDYSEFPVVDGPLSNSTYIESFQ
KVVNRHKELSGRGLDYQAI AFHIPYTKMGKALQSVLDQTDDEDNQERLMARYEESIRYSRRIGNLYTGS
LYLGLTSLLENSKSLQPGDRIGLFSYSGGAVSEFFTGYLEENYQEYLFQASHQEMLDSTRITVDEYETI
FSETLPEHGECAEYTSVDFPFSITKIENDIRYKI **SEQ ID NO:16**

10 *E. casseliflavus* (mvaE):

MEEVVIIDALRTPIGKYHGSGLKDYTAVELGTVAAKALLARNQQAHEHIAQVIIGNVLQAGSGQNPGRQVS
LQSLSSDIPASTINEVCGSGMKAILMGMEQIQLNKASVVLTTGGIESMTNAPLFSYYNKAEDQYSAPVST
MMHDGLTDAFSSKPMGLTAETVAERYGITRKEQDEFAYHSQMKAAKAQAAKKFDQEI VPLTEKSGTVLQD
EGIRAATTVEKLAELKTVFKKDGTVTAGNASTINDGAAMVLIASKSYCEEHQIPYLAVIKEIVEVGFAP
IMGISP IKAIDTLKQALTIEDIGIFEINEAFAASSIVVERELGLDPKKNRYGGGISLGHAI GATGAR
IATTVAYQLKDTQERYGIASLCVGGGLGLAMLENPSATASQTFDEESASEKTEKKKFYALAPNERLAF
LEAQGAITAAETLVFOEMTLNKETANHLIENQISEVEIPLGVGLNLQVNGKAYNVPLATEEPSVIAAMSN
GAKMAGPITTTSQERLLRGQIVFMDVQDPEAILAKVESEQATIFAVANETYPYIVKRGGGLRRVIGRNF
PAESDLATAYVSDLMVDVKDAMGANIINSILEGVAELFRKWFPEEEILFSILSNLATESLVTATCSVPF
DKLSKTGNRQVAGKIVHAADFADIDPYRAATHNKGIMNGVEALILATGNDTRAVSAACHGYAARNGRM
GLTSWTI IEDRLIGSITLPLAIATVGGATKI LPKAQAALALTGVETASELASLAASVGLVQNLALRALV
SEGIQQGHMSMQARSLAISVGAKEGTEIEQLAAKLAATQMNQEQARKFLTEIRN **SEQ ID NO:17**

15 *E. casseliflavus* (mvas)

MNVGIDKINFFVPPYFIDMVDLAHAREVDPNKFTIGIGQDQMAVNKKTQDIVTFAMHAAKDILTKEDLQA
IDMVIQVTESGIDESKASAVLHRLGLIQPFARSFEIKEACYGATAGLQFAKAHVQANPQSKVLVVASDI
ARYGLASGGVEYQGVAVAMMISADPAILQLENDNLMLTQDIYDFWRPVGHQYPMVDGHLNAVYIDSEFK
QVWQAHCEKNQRTAKDYAALSFIPIYTKMGKALLAVFAEEDETEQRMLMARYEESIVYSRRTGNLYTGS
LYLGLISLLENSSSLQANDRIGLFSYSGGAVAEFFSGLLVPGYEKQLAQAAHQALLDDRQKLTIAEYEA
FNETIDIDQDQSFEDLLYSIREIKNTIRYNEENE **SEQ ID NO:18**

Acetoacetyl-CoA-sintasa:

MTDVRFRHIGTGAYVPERIVSNDEVGAPAGVDDDWITRKTGIRQ
RRWAADDQATSDLATAAGRAALKAAGITPEQLTVIAVATSTPDRPQPPTAAYVQHHLG
ATGTAADFVNAVCSGTVFALSSVAGTLVYRGGYALVIGADLYSRILNPADRKTIVVLF
DGAGAMVLGPTSTGTGPIVRRVALHTFGGLTDLIRVPAGGSRQLD TDGLDAGLQYFA
MDGREVRRFVTEHLPQLIKGFLHEAGVDAADISHFVPHQANGVMLDEVFGELHLPRAT
MHRTVETYGN TGAASIPITMDAAVRAGSFRPGELVLLAGFGGMAASFALIEW **SEQ ID NO:19**

20 Isopreno sintasa:

Atggaagctcgtcgttctcggaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgctccgacacggacgagtcctcgaagatacaagacaagcg
aaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaattctgacacctgctggaactgattgacaacgtccagcgcctgggctggtacc

25

gtttcagctgatalccgtgggtgctgggacgcttcgttccctccggcggcttcgagcggtaaccaagacttccctgcacgggtacggcactgctttccgtctgctg
cgtcaaacaggtttgaggtttcicaggaaagcgttcagcggcttcaaa gaccnaaacggcaacttctggagaacctgaaggaagatatcaagctatcctgagcct
gtacgagggccagcttccctggctctggaaagcgaaacalcctggacgagggcguaggtttcgcactctctcactganaagaactgtctgaagaaaa gaticggtaaa
gagctggcagaacaggtgaacctgacctgggaactgccactgcacggcgtactcagcgtctggaaagcagatggtctatcgaaggctaccgtaaaaaaggagga
cgcgaalcaaggctctggagctggcaattctggatlaacaacatgaccagctctgtataccagcgtgaltctgcgtgaaacgtcccgttgggtggctctgtgtgggtct
ggcgaccnaaacgtgactttgctcgtgaccgctgattgagagcttactgggocgtgggtgtagcattgaaaccgcaacttccgactgcccgtaacctcgtcga
aaatgtttcttctgaaccaltatc gacgatattctacgaltatcggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgca gttgagcgttgggacgtaaacgcccac
aacgacctgocggatitacatgaaactgtgctttcggctctgtataacacattaaacgaaatcgcctacgacaacctgaaa gataaaagggtgagaacatcctgccgtat
ctgaccnaaacgctgggctgaccgtgcaacgcttccctgcaagaa gccaagtggtctgtacaaacaaatctactccgaccttgacgactacttccggcaacgcatgga
aatcctctctctggccgtgcaactggtgttcgcttacttccgtctgtgcagaaacttaaaaaggaaagatc gaaaacgtcnaaaatccatgacacctctc
gtcttcccaatctccgtctgtgcaatgacctggtagcgcgtcgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaatagcgtttctgttactagcgcactaaaggtat
ctccgaa gaaactggctaccgaaagcgtgatgaaactgaltcgtgaaacctggaaagagatgaaacggaaanaactgggtgtagcctgttccgcgaaaccgttcgt
ggaaaccgcgatcaactggcagcgtcaactcactgcactatcataacggcgcacgcgcataacctctccggatgagctgacctgcaaacgcgttctgtctgtaatca
ctgaaccgattctgcccgttgaacgctaa

ispA:

atggactttccgcagcaactcgaagcctgctgaa gcaaggccaaccaggcgcctgagccgtttatcggcccactgcccttca gaaactcccgtggtcgaacca
tgcagatagcgcattatagggtgtaagcgcctgcgaccttccctggtttatgccaccggctatagttggcgttagcacaacacgctggacgcaccgctgctg
ccgtagagtgatccacgcttactcaatcaatcagatgattaccggcgtggtgatgacgacatcgcgcgcggtttccgacctgccaatgtaggttggcgaagc
aaacgcgattctcgtgagcagctttacaaacgctggcgttctgattcaagcgtatgccgatagccggaagtgtcggatcgcgacagaatttcgatgattctga
actggcgaagcggcagcggatitggcggaaatgctgggtggcagggcactagattagacggcgaagcnaaacgtaccttggagcgcctgagcgtattcactc
tcataaaaccggccattgattcgcgccgcttccgttggctgattaaagcggcggagataaaggcgtcgtgctctccagctactgacaagatcagagagag
caltcggccttccctcaggctcaagatgacalccctgagatggtgtagga gatactgcaactgtggaaaacgccagggtccc gaccagcaacttggtaaaaglac
tacctgcaacttgggtctggcagcggcggaa gaaagcccggatctgactgacgtagtcccgtcagctgctgaaacaactggctgaacgtcactgatacct
cggcactggaagcgtacggaactacatcaaccagcgttaataaa

5

Amorfadieno sintasa con optimización de codones para *E. coli*:

ATGAGCCTGACCGAAGAAAAACCGATTTCGTCCGATTGCAAATTTTCCGCCTAGCATTGGGGTGAT
CAGTTTCTGATTTATGAGAAACAGGTTGAAACAGGCGTTGAGCAGATTGTTAATGATCTGAAAAA
AGAAGTTCCGACGCTGCTGAAAGAAGCACTGGATATTCGGATGAAACATGCCAATCTGCTGAAAC
TGATTGATGAAATTCAGCGTCTGGGTATCCCGTATCATTGAAACGTGAAATTTGATCATTGCCCTGC
AGTGCAATTTAGAAACCTATGGTGATAAATGGAATGGTGATCGTAGCAGCCTGTGGTTTCGCTGA
TCCGTA AACAGGGTTATATGTTACCTGCGACGTGTTTAAACAACTATAAAGATAAAAAACGGTGCCT
TTAAACAGAGCCTGGCAAAATGATGTTGAAGGTCTGCTGGAACCTGTATGAAGCAACCAGCATGCCG
GTTCCGGGTGAAATTTATTCTGGAAGATGCACTGGGTTTTACCCGTAGCCGTCTGAGCATGATGACC
AAAGATGCATTTAGCACCAATCCGGCACTGTTTACCGAAAATCCAGCGTGCACTGAAACAGCCGCT
GTGGAAACGCTGCTCCCTCGTATTGAAGCAGCACAGTATATCCGTTTTATCAGCAGCAGGATAGCCA
TAAACAAAACCTGCTGAAACTGGCAAAACTGGAATTTAATCTGCTGCAGAGCCTGCATAAAAGAAG
AACTGAGCCACGTTTGTAAATGGTGGAAAGCCTTCGACATCAAAAAAACGCACCGTGTCTGCGT
GATCGTATTGTTGAATGTTATTTTTGGGGTCTGGGTAGCCGTTTTGAACCGCAGTATAGCCGTGCA
CGTGTGTTTTTACCAAAGCAGTTGCAATTTACCTGATCGATGATAACCTATGACGCATATGGC
ACCTATGAGGAACCTGAAAACTTTACCGAAGCCGTTGAACGTTGGAGCATTACCTGTCTGGATACC
CTGCCGGAATATATGAAACCGATCTATAAACTGTTTCATGGACACCTATACCGAGATGGAAGAATTT
CTGGCAAAAGAAGGTCTACCGACCTGTTAATTTGCCGTAAGAATTTGTGAAAGAATTCGTGCGT
AACCTGATGGTTGAAAGCAAAATGGGCCAATGAAGTTCATATTCGGACCAACCGAAGAACATGATCC
GGTTGTGATTATACCGGTGGTGC AAACCTGCTGACCACCTGTTATCTGGGTATGAGCGATAT
TTTACC AAAGAAAGCGTTGAATGGGCAGTTAGCGCACCCCTCTGTTTCGTTATAGCGGTATTCT
GGTCTGCTCTGAACGATCTGATGACCCATAAAGCAGAACAAGAA

10

CGTAAACATAGCAGCAGCAGCCTGGAAAGCTATATGAAAGAATATAACGTGAACGAAGAGTATGCAC
AGACCCTGATTTACAAAGAAGTTGAGGACGTTTGGAAAGATATCAACCGTGAATATCTGACCACGAA
AAACATTCGCGTCCGCTGCTGATGGCAGTTATTTATCTGTGTCAGTTCTTGGAAAGTTTCAAGTATGCAGG
TAAAGATAACTTTACGCGTATGGGCGACGAATATAAACATCTGATTTAAAGCCTGCTGGTGTATCCGA
TGAGCATTAA

Farneseno sintasa con optimización de codones para *E. coli*:

ATGAGCACCTGCCGATTAGCAGCGTTAGCTTTAGCAGCAGCACCAGTCCGCTGGTTGTTGATGATAA
 AGTTAGCACCAAACCGGATGTTATTCGTACACCATGAACTTTAATGCAAGCATTGGGGTGATCAGT
 TTCTGACCTATGATGAACCGGAAGATCTGGTGATGAAAAAACAGCTGGTTGAAGAACTGAAAGAAGA
 AGTTAAAAAAGAGCTGATCACCATCAAAGGTAGCAATGAACCGATGCAGCATGTTAACTGATTGAA
 CTGATCGATGCCGTTACAGCGTCTGGGTATTGCATATCATTTTGAAGAAGAAATCGAAGAAGCCCTGCA
 GCATATTCATGTTACCTATGGTGAACAGTGGGTGGATAAAGAAAATCTGCAGAGCATTAGCCTGTGGT
 TTCGTCTGCTGCGTCAGCAGGGTTTTAATGTTAGCAGCGGTGTGTTTTAAAGATTTTATGGACGAGAAA
 GGCAAATTCAAAGAAAGCCCTGTGTAATGATGCACAGGGTATTCTGGCACTGTATGAAGCAGCATTAT
 GCGTGTGAAAGATGAAACCATTCTGGATAATGCACTGGAATTTACCAAAGTGCACCTGGATATCATTG
 CAAAAGATCCGAGCTGTGATAGCAGCCTGCGTACCCAGATTTCATCAGGCACTGAAACAGCCGCTGCG
 TCGTCTGCTGGCACGCATTGAAGCACTGCATTATATGCCGATTTATCAGCAAGAAACCAGCCATAATG
 AAGATCTGCTGAAACTGGCAAAACTGGATTTTAGCGTCTGCAGTCCATGCACAAAAAAGAAGTGAAG
 CCATATTTGTAATGGTGGAAAGATCTGGATCTGCAGAATAAACTGCCGTATGTTTCGTGATCGTGTG
 TGAAAGGTTATTTTTGGATTCTGAGCATCTATTATGAACCGCAGCATGCACGTACCCGTATGTTCTGA
 TGAAAACCTGTATGTGGCTGGTTGTGCTGGATGATACGTTTGATAATTATGGCACCTACGAGGAACTG
 GAAATCTTTACCCAGGCAGTTGAACGTTGGAGCATTAGTTGTCTGGATATGCTGCCGGAATACATGAA
 ACTGATTTATCAAGAAGTGGTGAACCTGCACGTTGAAATGGAAGAAAGTCTGGGCAAAGGTGGTAAA
 AACATTAGCAATAGTCTGTGTGTCAGGGTTCGTTGGCAGAAAGAAGTGGGTAGTCAGATTACCCTGGTTGA
 ACCAAAATGGCAAAACGTGGTGTTCATGCCACGCCGCTGGAAGAGTATATGAGCGTTAGCATGGTT
 ACCGGCACCTATGGTCTGATGATGTCACGTAGCTATGTTGGTCTGTTGATATTGTTACCGAAGATAC
 CTTTAAATGGGTGAGCAGCTATCCGCCTATTATCAAAGCAAGCTGTGTTATTGTTCCGCTGATGATG
 ATATTGTGAGCCACAAAGAAGAACAAGAACGCGGTCATGTTGCCAGCAGCATTGAATGTTATAGCAA
 AGAAAGTGGTGCAGCGAAGAAGAAGCCTGCGAATATATCAGCCGTAAGTGGAAAGATGCCTGGAA
 AGTTATTAATCGTGAAAGCCTGCGTCCGACCGCAGTTCCGTTTCCGCTGCTGATGCCTGCAATTAACCT
 GGCACGTATGTGTGAAAGTTCTGTATAGCGTTAATGATGGTTTTACCCATGCCGAAGGTGATATGAAAT
 CCTATATGAAAAGCTTCTTCGTGCATCCGATGGTTGTTTAA

pMCM1223 - pCL-Ptrc-Upper_GcMM_161 (*Listeria grayi* DSM 20601):

cccgtctactgtcgggaattcgcgttgccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataac
 aatttcacacaggaaacagcgcgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttacaattatcagacaatctgtgtggcactcgaccggaaattatcgttaactttattat
 taaaaattaaagggtatataatgatacgttaataaaggaggaataaacatggttaagacattgtaataattgatccctccgtactccatcggttaagaccgcggt
 cagctcctaaagatgacggcgggtggaattgggaaccgagttacaagcctctgttcgagaagaacgaccaggtcaagaccatgtagaacaagtcattttggcaacg
 tttacagcgaggaacggccagaatcccggcctcagatcgccttaattctggcctgcccagagataccggctcactatfaaccagggtgtgtgttcggcctga
 aagcaataagcatggcgcgcaacagatcctactcggagaagcggagtaatagtagcaggaggtatcgaatccatgacgaatgcgcccaggtattacatattataataa
 agaagaagacaccctcctcaaacctgttctacgatgacctcgtggtctgaccgacgcgttagcggaaagattatgggttaacagccgaaatgtgccgaacagta
 cggcgtatcagtgaggcccaggaccccttgcgtatggatcgcagatgaaagcagcaaaaggcccaagaacaggcatttccgagctgaataactgcctcttgaata
 ggggacgaagttactcaggacgagggggttcgtcaagagaccaccctcgaaaaattagctgcttcggaccattttaaagaagatgtactgttacagcgggcaa
 cgctcaacgatcaatgatggcgcctcagccgtgatcattgcaataaagggttctgagacaaaccagattccctactctgcatgatattacagagatagg
 cattgatccalcaataatggcaltgctcccgtgagtgcatcaataaactgacgatcgttaaccaatagcatggaagaatcgtatccttgaataatgaggcalttgc
 agcatcctcgggtgtagtcaaaaagagttaaagcattccgatgaaagatcaatattggcgggtccgggtattgactaggccatcctctggcggccacaggagcgcgat
 tgaaccaccctagcgcaccagtgaacgtacacacggacgctatgttgcctcctgtgaltggcgggtggccttggcctagcaatattaatagaagtgccctagga
 agatcagccggttaaaaaatttatcaattggcccgtgaggaccgtctgcttagactcaggagcaagccgtgatcagccagctacaaaacatgactggcagaatga
 cactctgaagataatgccgacaatctgacgaaaatcaataatctgaaatgaaatccctctgtgtgcttgaatctgagggtcaatgataagagttataccatcccac
 tagcaactgaggaaccgagtgtaatcgtcctgtaataatggtgcataaatggcaaacacctggcgggtttcagtcagaalaaaagatggttctcgtcgtggcaaa
 ttgacttatgaacgtcaagaaccgcaactatcgagcatatgatcagcggcagagaagcggcaattttcgtccgcagcgcagtcacatccatcgattgtgaaacga
 ggtgggggtcctaaagagatagtagtgcgtacgttcgatgatgatccgacgttcctgtctattgatctgatagttgatactaaagacgcaatggcgctaacatcattaaca
 ccattctcagggtgtagccggcttctgaggaaatcctaccgaagaatctgttctctatttatctaattacgaaccgaatcaatttgaccgccagctctgcatac

pMCM1224 - pCL-Ptrc-Upper_GcMM_162 (*Enterococcus faecium*)

cccgtctactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataac
aattcacacaggaacagcgcgcgtgagaaaaagcgaagcggcactgctctttacaattatcagacaatctgtgtggcactcgcaccggaaftatcgaattacfttattat
taaaaaftaaagaggatataatgatcgaatgaaataaggggaaataaacatgaaagaagtggtatgatgatgcgctcgcacaccattgggaaatacagaggta
gtcttagtcttttacagcgggtggagctggggacactggtcacgaaaggcgtcgtgataaaacaagcttaagaaagacaagatagaccaagtgatattcggcaatgtg
cttcagggcaggaacggacaaaacgttgaagacaataagccctgaacagtggtctaccagttgacgtccggcgtgacatfataacgaagtgtcgggtccggaatga
aagcgggtgatttagcccgccagftaatacagtttaggggagggcagagttggtcattgacgggggtacggagcaatgacacaagcaccatgctgaaacctfaccagtca
gagaccaacgaatacggagagccgafatcatcaatgftaatgacgggctgacggatgctgtttccaatgctacatgggtcttaccggcaaaaggtggcgaccaggt
ttcagtgctcgcggaggaacagaccgggtacgattgctcagccaatgaaagcagcgcacgggttgaagccgggggtgtctcagaagagattatccggftaagatt
agcgagcaggatcttgaatgacggcgtagtgctgtgattcttgcacaaagaaatgacgcggaaacaataatctgcttaccctggcgacgataaaggaggttgcgga
ggcaatgcttaccgcttcatatgggtattgcccccaataaagccattcaaaagttaacagatcggctggcgatgaaacctgtccacgattgatctgtcgaaffaatgaag
cattcggcctctagcattgttctcaagagctgcaattggacgaagaaaaagtgaatattctatggcggggcgatagccttaggccatccaatcggcgcaagcggga
gccccgatactgacaaccttagcatacggcctctcgtgagcaaaagcgttatggtattgctcattatgatcggcgggtgctgtgctgtgtagaagcta
afatggagcagaccacaagacgttcagaagaaaaagtttaccagcttaccctccgagcggagatcgcagcttatcagaagaacgttctgactcaagaacggc
acttattttccagggagcagacgttgcggaagaactgtccgatcacatgattgagaatcaggtctccgaagtggaaftccaatgggaattgcacaaaatttcagatfaatg
gcaagaaaaatggattctatggcactgaagaacctcagtaatagcggcagcgcgaacggcggcaaaatcgcgggaacatttgcgggaaacgcctcagcgg
cttatgcggggcagattgctctgttgcgaatcagaatatcaagccgtgataaatccgtgaaatcagcaaaagaagaactgattctttgcgcaaacgagctgaccgg
agtattgtaaacggggggaggtgtcaggatattctacgcgggagttatgggtcttttaccgcgtattatcaatcgaacttctggtggacgcaaggacgcaatgggg
gcaaacatgatcaacttattctcgaagcgttcaataaactgcgtgaaatggtccgggaagagaaatactgttctcatctgtcaaacctcgtacggagctccctgg
catctgatgttgcgagattcctttgaaagacttggctgtaacaaagaaatggtgaaacagatcggcaagaaatcaacagcaggggaaatgctaaagcctgaccctta
ccgcggcgaaccataacaaggggattatgaacggatcgaagccgtcgttccgcaacgggaaacgacacacggcgttctcgttcttaccgcttaccgcataccgcgc
ccgtaattggcttaccgaaggttaacggattgagcagatcaagggcgataaactggttgaataaatacagctccactggctgtggcactgtcgtggcgctcgaaca
tattacaaaagccaaagcttccctcggcatgctggatattgattccgcaaaagaactggcccaagtgatcggcggtaggttagcacagaatcgtcggcggttacgt
geattagtgacagaagcaltcagaagggacacatgggcttcaagcagcttcttagcagattcgaatggtccatcggtagggagatagcaagtcggcaaaaaac
tgcgtgaagctgaaaaaatgaatcagcaaacggcaatacagattttgaaaaaatcgcgagaatgatctagacgcactagggatataccaatgaaatcgggtattg
accgtctgtcttctcatcccgaattgtatttgacatgactgagctggcagaatcagcgggggatgatcagctaaatcatatttggaaatcggacaagatcagatggc
agtgaatcgcgcaaacgagacatcataactgggtgcaaacgctgcgagtaagatcgtgacagagaaagaccgcgagttgattgatattgtaatcgttggcagcga
atcaggaaatgaccactccaaagcaagcggcgtgatttaccatctcttaaaatcagctgttcgccgttttcgaggtaaaagaaacttctatggcggaaactgctg
ccctgcacatggcgaagagatgtcaaaaaatcaccggagcgtgaaggtcttggtaattgctcagacatcgcgcgttatggttggccagcggaggaagttactcaa
ggcgtggggccgtagccatgatattacaaaaaccccggattcttctgattgaagacgatagtgttttctcagagagatactatgatttctggcggcctgattactc
cagatcctgttagtggacggcccccttcaaaccaactcaacgtatataagagatgttccagaaaggttggaaaccggcacaaggaattgtcgggaagggctggaaatgatc
aagctattgcttttccataccctatacgaagatgggtaagaagcgtccagaggtttttagaccaaaccgatgaaagataaccaggagcgttcaatgcttagatgagg
agtctatctgatagccggagaattgtaaacctgtacacagggcagcttgtacctgtgcttacaagcttgttgaaacactaaaagttacaaccggggagatcggatcgg
cctcttttctatggcagtggtgctggtgtccgagttcttaccgggtatttagaagaaaattaccagagttacctgttcgctcaaacccatcaagaatcgtgtagaccgga
ctcggattacggtcgtgataatcagaccatctttcagagactctgccagaacatggtgaatgcgccgaatatacagcgcagcttccctttctataccaagattgagaa
cgacatctgtattataaaatcgtactgcagctggfaccatattggaaftcgaagcttggggcccgaacaaaaactcactcagaagaggatcgaatagcggcgtcgaaca
tcatcatcatcatcattgattaaacggtctccagcttggctgtttggcggatgagagaagatttccagctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggctgataaaa
acagaatttgcctggcggcagtagcgggtgttccacctgaccatcggcaactcagaagtgaaacgccgtagcggcagtgtagtggggctcctccatgca
gagtagggaaactccaggcatcaataaaacgaaggtcagctgaaagactgggcttctgtttatctgttgttgcggtgacgctctctgagtagacaatccg
ccgggagcggattgaaactggtcgaagcaacggccccggaggggtggcgggacggcggccataaacctccaggcatcaaatgaaagcagaagccatcctgacg
gatggcctttttgcttctacaactctttttgtatttttcaataatcacaatattatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatcgtcgtaatagcg
aagagccccgcaccgatcggccttccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcggctgatgctgattttctccttaccgactgttggcgtatttccaccgcatat
ggtgactctcagtaactctgctctgatccgcatagftaagccagcccgaacccggcaacaccgctgacgagcttagtaagccctcgtatgatttfaatcgggat
gttgcgattactcggcaactattgcgalaacaagaaaaagccagccttcalgalatctcccaatlttltgtagggcttattatgacgcttcaaaaataaaaaagcagact
gacctgatatttggctgtgagcaattatgtcttagtgcattcaacgctttagtgaagccggcggcgaagcggcgtcggcttgaacgaattgttagacatttggccgac
tacctgtgatctcgcctttcacgtatgtggcaaaattctccaactgactcgcgcggagggcaagcagcttctcttctccaagataagcctgtctagcttcaagatgac
gggctgatactggggcggcagggcgtccattgcccagctggcagcagatcttccggcggcgaatttggcgttactgcgctglacaaatggggacaacgtaagcact
acatttgcctatcggcagccagctggggcggcaggttccatagcgttaaggttcaatlagcggcctcaaatgatcctgttcaggaaaccggatcaaaaggttccctccg
gctggacctacaaggcaacgctatgttcttctgttttgcagcaagatagccagatcaatgctgatcgtggctggctcgaagatacttcaagaatgctattgctgctcc
atttccaaatgcaagcttgcgctttagctgataacgccacggaatgatgctgctgfcacaacaatggtgacttctacagcgggagaatcctcctcctcaggggaag
ccgaagttccaaaaggtcgtgatcaaaagctcggcgggttcaatcaagccttaccggtaccgtaaacagcaaatcaatcactgtgtgcttaccggcccatccac
tggcggagccgtacaatgtagcggcagcaacgtcggctcagatggcgtcgtatgacgcaactacctctgatagttgagtcgatacttggcgtaccgcttccctca

atccgataatagttcctccttcagcaaaaaaccctcaagaccggttttagaggcccaagggttatgctagttattgctcagcgggtgcag
cagccaactcagcttcttcgggctttgtagcagccggatctcagtggtggtggtggtgctcgaagcattaatccacctttaaaccctg
ctccgtcggcttggttaccgttactttaccgccagcacctgcaactgcttcggcaacctgattacattttccgggtgcagtaagagctaccatac
atccgccccaccggcaccggttatcttagcgcacaaaggctcccgcagcgcgggctgaataaatcagctgagacagctccaaaatgttca
caccagcgcacccaacaggccttgattgacgttcatcagacgacctatagaagcagatgaccactgagaacaagttgttcgccaatccg
gctgatctttccaatggacgtcacaagcgggtcaataaggtctgatatgactctcaactggcgaacattggccaccagctctttggtgag
gaaaataccccgtgctgccaataacaatgccacaatccgggtgtttgagttttctacgctcaggtatcgtcactacccccaaacgtgctca
cataagtgtctgtggtgatgctgcacctgcacctgatttcaatctcgtgctcccaatttcgcaatttctgtaaactaaggccgaatccgaaaa
gctcgttfaacgctccaatactcgaattgtcacagctgctgaactgcccaaccagaacctacaggtatgtccgaatctacagtaaggaaac
actccgttgattgggatagatttgcgcactttctcgttactgccgagacgtacggatgttttcgaagtcgagccctgtacggcctatttgaga
ctgaatcgtgatgctgctgctcagctcagcgcgaactctagtacgcagttcactgacatgcgatggcagtttaccgtatactactgcatgc
tcaccaaacagatatacttccgggcgcagagcagctccatgccctggaaatagaggttctcactccagctccatgatgatggtgatg
gtgcatatgtatatactccttctaaagttaaacaaaattattctagaggggaattgttatccgctcacaattcccctatagtgaagtcgtattaattc
gctgggatcagatctcgatectctacgccggacgcacgtggtccggcaccacggcgcacaggtgcgggttctggtccctatctgcc
gacatcaccgatggggaagatcgggctcgcacttcgggctcatgagcgttgttccggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgg
gggactgttgggcccactccttgcacaccattccttgcggcggcgggtgctaacggcctaacctactactgggctgcttctaatagca
ggagtgcataagggaagcgtcagatcccggacaccatcgaatggcgcacaaaccttcgcgggtatggcatgatagcgccgggaaga
gagtcattcaggggtggaatgtgaaaccagtaacgttatacgtatgcagagatgccgggtgctcttatcagaccgtttcccgcgtggt
gaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaaagcggcgtatggcggagctgaattacatccaaccgcgtggca
caacaactggcgggcaaacagctgttctgattggcgttccacctccagctggccctgcacgcgccgtcgaatgtcgcggcgatta
aatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgctgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaaagcggcggtgcacaat
cttctcgcgaacgcgtcagtggtgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgctgactaatgttccg
gcgttatttctgatgtctgaccagacaccatcaacagtattatttctccatgaagacggtagcgcactgggctgaggcatctggtc
cattgggtcaccagcaaatcgcgtgtagcgggccattaaagtctcctcggcgcgtctgctgctggtggtgctgataatctcactc
gcaatcaaatcagccgatagcgggaacggggaagcgcactggagtgccatgtccggtttcaacaaacctgcaaatgctgaatgagggca
tcgttcccactgcgatgctggttggcaacgatcagatggcgttggcgcgaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgcgttgggtcgg
atatctcggtagtgggatagcagataaccgaagacagctcatgttatatcccgccgtaaccaccatcaaacaggatttccctgctggggc
aaaccagcgtggaccgcttctgcaactctcagggccagcgggtgaagggcaatcagctgttcccgtctcactggtgaaaagaaaa
ccacctggcgccecaatagcaaacgcctctccccgcggttggccgattcaatgagctggcagcagaggttcccactggaaa
gcgggcagtgagcgaacgaattaatgtaagtttagctcactattaggcaccgggatctgaccgatgccctgagagccttcaaccag
tcagctccttccggtgggcgcggggcagactatcgtccgcacttatgactgtcttcttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcag
cgctctgggtcattttcggcagggaccgcttctgctggagcgcgacgatgacggcctgctgcttgcgggtattcgggaatcttcacgcctc
gctcaagcctcgtcactggtcccgccaccaaacgttccggcgaagaagcaggccattatcggcggcatggcggccccacgggtgcgcat
gatcgtctcctgctggtgaggaccggctaggtgctggcggggttgccttactggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtga
agcagctgctgcaaaaacgtctgcgacctgagcaacaatgaaatgctctcgggttccggttctgtaaagtctggaacgcggaagtc
agcgcctgacaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctgctacacctgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgtggtc
attgacctgagtgattttctctggtcccgcccatcaccgccagttgtttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttcatatca
gtaaccgcatcgtgagcatctctctggttcatcgggtatcattacccccatgaacagaaatcccccttacacggagcatcagtgacaaa
caggaaaaaacgcccttaacatggcccgtttatcagaagccagacattaacgcttctggagaactcaacgagctggacgcggatgaa
caggcagacatctgtaategttccacgaccacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgcgttccggtgatgacggtgaaaacctctg
acacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcaggcgcgtcagcgggtgtt
ggcgggtgctggggcgcagccatgaccagtcacgtagcagatagcggagtgatactggttaactatgcggcatcagagcagattgtac
tgagagtgcacatatatcggtgtgaaataaccgcacagatgcgtaaggagaaaataaccgcatcagggcgtcttccgcttctcgtcactg
actcgtcgcgtcggctgttcggctgcggcagcgggtatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggggataacg
caggaaaagaacatgtgagcaaaaggccaagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggcgttttccataggctccgcccc
cctgacgagcatcaaaaaatcagcgtcaagtacagaggtggcgaacccgacaggactataaagataccaggcgttccccctggaag
ctccctcgtgctcctctgttccgacctgccgcttaccggatacctgctgccttctccttccgggaagcgtggcgttctctatagctcac
gctgtaggtatctcagttcgggtgtagctgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttccagcccaccgctgccttacc

ggtaactatcgtcttgagccaacccggtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatg
taggcgggtgctacagagttctgaagtgggctactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagtta
ccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctgtagcgggtggttttttggcaagcagcagattacgcgca
gaaaaaaaggatcacaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactacgtaagggattttggtcatgaa
caataaaactgtctgcttacataaacaagtaatacaaggggtgtatgagccatattcaacgggaaacgtctgcttagccgcgattaaattc
caacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgctgggcaatcaggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagcccga
tgcgccagagttgttctgaaacatggcaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttat
gcctctccgaccatcaagcattttatccgtactctgatgatgatggttactaccactgcgatccccgggaaaacagcattccaggtatta
gaagaatatectgattcaggtgaaaatattgtgatgctgctggcaggtttcctgcccgggttcattcattcctgtttgtaattgctctttaaca
gcgatcgcgtatttctgctcgcacagggcgaatcacgaatgaataacggttgggtgatgaggtattttgatgacgagcgaatgctggc
ctgttgaacaagctggaaagaaatgcataaaactttgccattctaccggattcagtcgctactcatggtgatttctacttgataacctatttt
gacgaggggaaataataggttattgatgttgacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttccatctatggaactgcctcgg
tgagtttctccttattacagaaacggccttttcaaaaatggtattgataatctgatatgaataaattgcagtttcattgatgctcgtatgagttt
tctaagaallaalcatgagcggalacalallgaalglallagaaaaataaacaaalagggglccgcgcacallccccgaaaaglgccac
ctgaaattgtaaacgttaaatattttgtaaaaattcgcgttaaattttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatccctt
ataaatcaaaaagaatagaccgagataggggtgagtggttccagtttgaacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaa
gggcgaaaaaccgtctatcagggcgtggcccactacgtgaaccatccctaatacagtttttggggcgcaggtgccaagcactaa
atcggaaaccctaaagggagccccgatttagagcttgacggggaagccggcgaacgtggcgagaaaaggaaggggaagaaagcgaaa
ggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacaccggcgcgcttaatgcgccgctacagggc
gcgtccattcgcca

MCM1742

aaagtagccgaagatgacggttgtcacatggagttggcaggtatgttattaaaagcaattaaccctactaaagggcggccgcgaagttc
ctattcttagaaaagtataggaacttattctaccgggtgaggggagggcgttttcccaaggcagctctggaatgcgcttttagcagccccgt
gggcaacttggcgctacacaagtggcctctggcctcgcacacattccacatccaccggtaggcgccaaccggctccgttcttgggtggcccc
ttcgcgccaccttccactctcccctagtcaggaagtccccccggcccgcagctcgcgctgagcaggacgtgacaaatggaagtagca
cgtctcactagtctgctgagatggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtagggcctttggggcagcggccaatagcagctttgctct
tcgctttctgggctcagaggctgggaaggggtgggtccggggggcgggctcagggggcgggctcagggggcggggcggcggccgaag
gtcctccggagggccggcattctgcacgctcaaaaagcgcacgtctgccgcgctgttctcctctctctctccggcctttcagctgacg
cagcacgtgttgacaattaatcctggcagatgataatcggcagatgataatacacaaggtgaggaactaaacctggagaaaaaatcact
ggatataaccaccgttatataatcccaatggcagcgtaaaagaacatttgaggcatttcagctcagttgctcaatgacctataaccagaccgtca
gctggatattacggccttttaaaagaccgtaaaagaaaaataagcacaagtttatccggcctttattcactcttcccgcctgatgaatgctca
tccggaaattccgtatggcaatgaaagacggtgagctggtgatatgggatagtgtcaccctgttacaccgttttccatgagcaaacgaaac
gttttctcgtctgagtgaaataaccacgacgatttccggcagtttctacacataatcgaagatgtggcgtgttacgggtgaaaacctggcct
atttccctaaagggtttattgagaatatttttctcagccaatccctgggtgagttaccagttttgatttaaacgtggccaatattggacaa
cttctcgcccccgtttaccatgggcaaatattatagcaaggcgacaaggtgctgatccgctggcgattcaggttcacatgccgtttgt
gatggcttccatgctggcagaatgcttaataaataaacagactgcgatgagtgccagggcggggcgtaaagcgggactctgggggttcg
aataaaagaccgaccaagcgcagctctgagagctccctggcgaattcgggtaccaataaaaagcgtttattttatgatctgtgtgtttgtttgtg
tgcggcgcggaagtctctctagaaaagtataggaacttctcagccctatagtgagtcgtattaagataaacctctgcgggtgataaatt
atctctggcgggtgllgacglaaataaccactggcgglgatactgagcacatcagcagggacgcactgcTCTAAGGATTAAGA
GGAGAAGATTTCTGatgtatcatttaataagggaggaataacatattgtatcctgttctgcgccgggtaagatttacctgttc
ggtgaacacgccgtatgtttatggcgaactgcaattgcgtgtcgggtggaactgcgtaccctgttgcgcggaactcaatgactctatcac
tattcagagccagatcggccgaccggctgtgatttcgaaaagcacccttatgtctcgcgtaattgagaaaatgcgcaaatctattcctatt
aacggtgttttctgaccgtcattccgacatcccgggtggctccggctcgggtagcagcgcagccgttactatcgcgctattgtgtcgcgtg
aacgagctgttcggctttggcctcagcctgcaagaaatcgtaaaactggccacgaaatcgaattaaagtacaggggtccgcgtccccaa
ccgatagctatgtttctaccctcggcggcgtggttaccatcccggaacgtcgcaaacgaaaactccggactgcggcattgtgattggcgata
ccggcgttttctcctccacaaagagtttagtactaacgtacgtcagctgcgcgaaagctaccggatttgatgaaccgtgatgacctcta
ttggcaaaatctctcgtatcggcgaacaactggttctgtctgctgactacgcatccatcggccgctgatgaacgtcaaccagggctcctg

aaagtagccgaagatgacggttgtcacatggagttggcaggatgtttgattaaaagcaattaaccctcactaaagggcggccgcgaagttc
ctattctctagaaagtataaggaacttcattctaccgggtaggggagggcgttttcccaaggcagctctggagcatgcgctttagcagccccgt
gggcaactggcgtacacaagtggcctctggcctcgcacacattccacatccaccggtaggcgccaaccggctccgttcttggggcccc
ttcgcgccaccttcactcctccctagtcaggaagtcccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaaatggaagtagca
cgtctcactagtctcgtgcagatggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggcctttggggcagcggccaatagcagctttgctcct
tcgctttctgggctcagaggctgggaaggggtgggtccggggggcgggctcagggggcgggctcagggggcggggcgggcccgaag
gtcctccggagggccggcattctgcacgctcaaaagcgcacgtctgccgcgtgttctcctctctcctcctccggccttgcacctgcag
cagcacgtgttgacaattaatcctggcatagtatatcggcatagtataatacacaaggtgaggaactaaacctggagaaaaaaactact
ggatataaccaccgttatatcccgaatggcctgtaaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgacctataaccagaccgtca
gctggatattacggccttttaaaagaccgtaaaagaaaaaagcacaaagtttatccggcctttattcattctgcccgcctgatgaatgctca
tccggaaatccgatggcaatgaaagacgggtgagctgggtgatagggataggttaccctgtttaccggtttccatgagcaaacgaaac
gttttcatcgtctggagtgaaatccacgacgatttccggcagtttctacacataatccgcaagatgtggcgtgttacggtgaaaacctggcct
atftccctaaagggtttattgagaatgttttctcagccaatccctgggtgagttaccagttttgattaaactggccaatattggacaa
cttctcggccccgtttaccatgggcaaatattatcagcaaggcgacaaggtgctgatccgctggcgattcaggttcacatgccgtttgt
gatggcttccatgctggcagaatgcttaataaactaacagactgctgagtggtggcagggcgggcgtaagcgggactctggggctc
aataaagaccgaccaagcgacgtctgagagctccctggcgaatccgggtaccaataaaagagctttatttcatgatctgtgtgtttgtt
tgcggcgcggaaagttcctattctctagaaagtataaggaactcctcagaccctatagtgagtcgtattaagataacctctgctgataaatt
atctctggcgggtgttgacgtaaataccactggcgggtgatactgagcacatcagcaggacgactgcTCCTAGGGGCGATTA
GGGGACCTACTACatgtatcgatttaataaggagggaataacatgataacgtgctctgcgccgggcaaaagtatactctcgg
cgaacatgcagttgtatcggagagccggcgatagctgtgcggtcgatattagaacgcgcgtgacagctctcctgccgataccataacta
tctctcaagtctcggcacaacggggatcgatttcgaggttcacccctatgtgctggccgtgttggagcggttccaggaatattcattcttggac
gggtgatctgagaataagctccgacataaccgggtggatccggcttggctcatccgccgagtaacgggtggcactataaaggctatgga
tacctgcttgacctggggctggagttgacgataatcgttaagatgggccaatgaggttgaacaaaacattcagggcacggcttctcctacgg
acacttatgtgtgacctgggaggtgtcgtcctgataccccagcggaaaaagttagagctgatagactgcgggattttgatcggtaacacc
aatatattctgctccagaggagttggtgggtaatgtagcggatctgaacgaacgggtccccgatgttgtaggtccagttcttagttctattgg
gaaactgagtgtaatcggagagggcttagtcaatgaccgggattacgttagcgtgggggaactgatgaacatcaccaggggtctgtagat
gcaataggtgtttctgtgcagaactgcaagctgatttacgccgccgtgaatcaggcgcttatgggtctaaagattacaggagcgggtgg
aggggggatgtatggtgtatcagctccgcgtgaaaatgtggatagcgtcgtgaagcaatagggatggccgggtggcaaggtgtgtgttc
aaacgcaacagatacgggtgtcgtagaatgtcagtaagctaatgtcagataggcctgcacccttaaggaggaaaaaacatgtcagagt
tgagagcc

pMCM2020 - pTrcAlba-bMVK

gtttgacagcttattcactgactgcacgggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggatggctgtgcaggtcgtaaat
cactgcataatcgtgtcgtcaaggcgcactcccgttctggataatgtttttgcgccgacatcataacgggtctggcaaatattctgaaatga
gctgttgacaattaatcaccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaaacagcggcgtgagaaaaagc
gaagcggcactgctcttaacaatttatcagacaatctgtgtggcactcgaccggaattatcgattaactttattataaaatgaaagaggtat
atattaatgtatcgattaaataaggagggaataaacatggaacgcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctg
ctgtcctccgacacggacgagtcctcgaagtatacaagacaaaagcgaaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaa
aaagcagaatttctgacctgctggaactgattgacaacgtccagcgcctggcctgggttaccgttctgagctgatatccgtgtgtcgtcgt
gatcgttctgttctccggcggcttcgatcggtaaccaagacttccctgcacgggtacggcactgtcttccgtctgctgcgtaaacacggtt
ttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaaagacaaaacggcaactcctggagaacctgaaggaaatatacaagctatcctgag
cctgtacgagggcagcttctggtcctggaagggcaaacatcctggacgagggcgaaggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctg
aagaaaaatcgggtaaaagagctggcagaacaggtgaacatgcaactggcaactgccactgcatcggcgtactcagcgtctggaagcagat
ggcttatcagcggcctaccgtaaaaaggagggacgcgaatcagggtctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagctgtatac
cagcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttgggtggcgtcgtgtgggtctggcgacaaaactgactttgctgtgaccgctgattgagagctt
ctactgggccgtgggtgtagcattcgaaccgaatactccgactgccgtaactccgtcgaaaaaatgtttgttctgtaaccattatcagacat

tgaatgtgaaaccagtaacgttatac gatgtcgcagagtatgccgggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccac
 gtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaaagcggcgatggcggagctgaattacattccaaccgcgtggcacaacaactggcgggca
 aacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagctctggccctgcacgcgccgtcgcgcaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaa
 ctgggtgccagcgtggtggtgctgatgtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcgggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgt
 cagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgtgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttctgatgtct
 ctgaccagacacctcaacagattattttctccatgaagacgggtacgcgactgggctggagcatctggcgcattgggtcaccagcaa
 atcgcgctgttagcgggccattaaagtctgtctcggcgcgtctgcgtctgctggctggcataaatactcactcgcaatcaaattcagccg
 atagcggaaagggaagggcactggagtgccatgtccggtttcaacaaccatgcaaatgctgaatgagggcactgttcccactgcgatg
 ctggtgccaacgatcagatggcgtgggcccgaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgcgttggtgcggatctcggtagtgga
 tacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccacctcaaacaggattttccctgctggggcacaaccagcgtggacc
 gcttgcgcaactctcagggccaggcgggtgaagggcaatcagctgttcccgtctcactgggtgaaaagaaaaaccacctggcgccca
 atacgcaaacgcctctccccgcgcttgccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcccactggaagcgggcaagtgagcgc
 aacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg

pMCM2095 - pTrcAlba-mMVK(del)

gtttgacagcttatcagactgcacgggtgcaccaatgcttctggcgtcagggcagccatcggaaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaat
 cactgcataatcgtgctgctcaaggcgcactcccgttctgataatgtttttgcccgcacatcataacggttctggcaaatattctgaaatga
 gctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaaacagcggcgtgagaaaaagc
 gaagcggcactgctcttaacaatttatcagacaatctgtgtggcactcagccggaattatcgattaactttattataaaaattaaagaggtat
 atattaatgtatcgattaaataaggaggataaaacctggaagctcgtctgtcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgc
 tgcctccgacacggacgagtcacgaagtatacaaaagcaaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaa
 aagcagaatttctgacctgctggaactgattgacaacgtccagcgcctgggctgggtaccgtttcagctctgatatccgtgggtgcgctgg
 atcgtctcgtttccctccggcggcttcgatcggtaaccaagacttccctgcacgggtacggcactgctttccgctcgtcgcgcaaacacggttt
 gaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaaagaccaaaacggcaacttctggagaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcc
 tgtacgagggcagcttctgctcgtggaagcgaaaacatctggacgagcgaaggtttcgaatctctcactgaaagaactgtctgaa
 gaaaagatcggtaagagctggcagaacaggtgaacatgactggactgccaactgcacgccgactcagcgtctggaagcagatg
 gtctatcagagcctaccgtaaaaaagagagcgcgaatcaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagctctgtatacc
 agcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcactttgctcgtgaccgctgattgagagcttct
 actgggcccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactccgtaactccgtcgcaaaaatgttttcttctgtaaccattatcagcगतat
 ctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccggatt
 acatgaaactgtgctttctgctcgtgataaactattaacgaaatcgcctacgacaacctgaaagataaaggtgagaacatcctgccgtatct
 gaccaaaagcctgggctgacctgtgcaacgtttctgcagaagcgaagtggctgtacaacaatctactccgacctttgacgactactcgc
 gcaacgcagtgaaatccttcttggcccgtgcaactggtgttcgcttactcgtcgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaac
 ctgcaaaaataccatgacacctctctcgtccttccatattctcctgtctgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtg
 aaaccgcaaatagcgtttctgttatcgcgactaaaaggtatctccgaaagactggctaccgaaagcgtgatgaaatctgatgaaacct
 ggaaaaagatgaacaaggaaaaactgagtgtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcact
 gcaactatcataacggcgcacgcgcataacctccggatgagctgacccgcaaacgcgttctgtctgtaatcactgaaccgattctgccgtttg
 aacgctaactgcataaaggaggtaaaaaacatgtatcctgttctgcgccgggtaagattagctagttaaagttaaaccggtctccagcttg
 gctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggctgataaaacagaatttcctggcggc
 agtagcgcggtgtccacctgacccatgccgaactcagaagtgaacgccgtagcggcgtggtagtgtgggtctccccatcgag
 agtagggaaactgccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcttctgtttatctgtgtttgtcgggtgaacgtctcct
 gtagtagcaaatccgggggagcggattgaaactgcaagcgaacggcccggagggtggcgggacggacggccgataaactgc
 caggcatcaaatgaagcagaagggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttgtttatctttaaatacattcaaatatgat
 ccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagatgagattcaacatttccgtcgcacctatttcccttt
 tttgcggcattttgcttctgtttttgctcaccagaacgctgtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcagagtggttcat
 cgaactggatcacaacgcggtaagatcctgagagttttgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggc
 gcggtattatccgtgttagcggcggcaagagcaactcggcgcgcatacactattctcagaatgactgtgtgagtactaccagtcac
 agaaaagcactcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgcataacctgagtgataaactgcggccaacttacttctga

REIVINDICACIONES

1. Células bacterianas recombinantes capaces de una producción aumentada de isopreno en las que las células se modifican por ingeniería genética mediante modulación de la actividad citrato sintasa para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de isopreno de manera que la actividad de citrato sintasa se disminuye, y en las que la actividad de las siguientes enzimas:
- (a) fosfotransacetilasa
- (b) acetato cinasa, y
- (c) lactato deshidrogenasa,
- se modula,
- y en las que opcionalmente la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en:
- (d) malato deshidrogenasa,
- (e) piruvato deshidrogenasa,
- (f) fosfogluconolactonasa (PGL), y
- (g) fosfoenolpiruvato carboxilasa
- se modula, y en las que dichas células comprenden además (i) uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de mevalonato (MVA) y (ii) uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido de isopreno sintasa; y en las que dichas células producen cantidades aumentadas de isopreno en comparación con células productoras de isopreno que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia isopreno.
2. Células bacterianas según la reivindicación 1,
- (A) en las que el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA superior, en las que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA superior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de AA-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa, en las que opcionalmente dichos uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la ruta de mevalonato (MVA) superior son un gen *mvaE* y un gen *mvaS*, y en las que además opcionalmente el gen *mvaE* y el gen *mvaS* se seleccionan del grupo que consiste en:
- (a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Listeria grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Enterococcus faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Enterococcus gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Enterococcus casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *Enterococcus faecalis*, o
- (B) en las que el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA inferior, en las que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA inferior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de MVK, PMK y MVD, en las que opcionalmente la MVK se selecciona del grupo que consiste en mevalonato cinasa de *Metanosarcina mazei*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Metanococcoides burtonii*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus sakei*, polipéptido de mevalonato cinasa de levadura, polipéptido de mevalonato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus pneumoniae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* y polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* CL190, o
- (C) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de DXP, o
- (D) en las que el polipéptido de isopreno sintasa es un polipéptido de *Pueraria* o *Populus* o un híbrido, *Populus alba* × *Populus tremula* o variante del mismo, o
- (E) en las que las células son células bacterianas Gram-positivas, células de *Streptomyces*, células bacterianas Gram-negativas, células de *Escherichia* o células de *Pantoea*, o
- (F) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH, en las que opcionalmente el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*, o

(G) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, o

5 (H) en las que la actividad de fosfoacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno en las que la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfoacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfoacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno, o

10 (I) en las que la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno, en las que el gen de lactato deshidrogenasa endógeno expresión se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

15 (J) en las que la malato deshidrogenasa es una malato deshidrogenasa dependiente de NADP y en las que la actividad de la malato deshidrogenasa dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP, en las que el gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP es un gen endógeno, y en las que la expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético, o

20 (K) en las que las células comprenden además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de malato deshidrogenasa dependiente de NADP, o

25 (L) en las que la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa y en las que la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno, en las que el uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos, y en las que la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos, o

35 (M) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del complejo de piruvato deshidrogenasa del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa, en las que opcionalmente la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno; o

40 (N) en las que la actividad de PGL se modula atenuando la actividad de un gen de PGL endógeno, en las que la actividad de PGL se atenúa reemplazando el promotor del gen de PGL endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético y/o en las que la actividad de una PGL endógena se atenúa mediante delección del gen de PGL endógeno; o

45 (O) en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno, en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se atenúa reemplazando el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético y/o en las que la actividad de una fosfoenolpiruvato carboxilasa endógena se atenúa mediante delección del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno, o

50 (P) que comprende además uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de difosfato de isopentenilo delta-isomerasa (IDI).

3. Células bacterianas según

55 (i) la reivindicación 1 o la reivindicación 2(H), en las que las células producen cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfoacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o

60 (ii) la reivindicación 1 o la reivindicación 2(I), en las que las células producen cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

65 (iii) la reivindicación 2(J), en las que las células producen cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP; o

(iv) una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2(L) o 2(M), en las que las células producen cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula.

5 4. Células bacterianas según

(i) una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2(F) o 2(G), en las que la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa; o

10 (ii) una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2(A), 2(B), 2(C), 2(D), 2(E), 2(H) o 3(i), en las que la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o

15 (iii) una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2(I) o 3(ii), en las que la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

20 (iv) una cualquiera de las reivindicaciones 2(J) o 3(iii), en las que el aumento de la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP aumentada; o

25 (v) una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2(L) o 2(M) o 3(iv), en las que la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada.

30 5. Células bacterianas recombinantes capaces de dar una producción aumentada de mevalonato en las que las células se modifican por ingeniería genética mediante modulación de la actividad citrato sintasa para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato de manera que la actividad de citrato sintasa se disminuye, y en las que la actividad de las siguientes enzimas:

(a) fosfotransacetilasa

35 (b) acetato cinasa, y

40 (c) lactato deshidrogenasa,

se modula,

45 y en las que opcionalmente la actividad de una o más enzimas del grupo que consiste en:

(d) malato deshidrogenasa,

50 (e) piruvato deshidrogenasa,

(f) fosfogluconolactonasa (PGL), y

(g) fosfoenolpiruvato carboxilasa

55 se modula, y en las que dichas células comprenden además uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de mevalonato (MVA) superior; y en las que las células producen cantidades aumentadas de mevalonato en comparación con células productoras de mevalonato que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia mevalonato.

60 6. Células bacterianas según la reivindicación 5,

(A) en las que dichos uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la ruta de mevalonato (MVA) superior son un gen *mvaE* y un gen *mvaS*; o

65 (B) en las que el gen *mvaE* y el gen *mvaS* se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *L. grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecalis*; o

5 (C) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH, en las que opcionalmente el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*; o

10 (D) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético; o

15 (E) en las que la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno en las que la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfotransacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno; o

20 (F) en las que la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno, en las que la expresión del gen de lactato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

25 (G) en las que la malato deshidrogenasa es una malato deshidrogenasa dependiente de NADP y en las que la actividad de la malato deshidrogenasa dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP, en las que el gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP es un gen endógeno, y en las que la expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético; o

30 (H) en las que las células comprenden además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de malato deshidrogenasa dependiente de NADP; o

35 (I) en las que la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa y en las que la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno, en las que la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno, o en las que el uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos, y en las que la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos; o

45 (J) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del complejo de piruvato deshidrogenasa del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa; o

50 (K) en las que la actividad de PGL se modula atenuando la actividad de un gen de PGL endógeno, en las que la actividad de PGL se atenúa reemplazando el promotor del gen de PGL endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, o en las que la actividad de una PGL endógena se atenúa mediante delección del gen de PGL endógeno; o

55 (L) en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno, en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se atenúa reemplazando el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, o en las que la actividad de una fosfoenolpiruvato carboxilasa endógena se atenúa mediante delección del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno.

7. Células bacterianas según

60 (i) la reivindicación 5 o la reivindicación 6(E), en las que las células producen cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o

65 (ii) la reivindicación 5 o la reivindicación 6(F), en las que las células producen cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

- (iii) la reivindicación 6(G), en las que las células producen cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP; o
- 5 (iv) una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6(I) o 6(J), en las que las células producen cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula.
- 10 8. Células bacterianas según
- (i) una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6(C), en las que la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa; o
- 15 (ii) una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6(A), 6(B), 6(E) o 7(i), en las que la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o
- 20 (iii) una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6(F) o 7(ii), en las que la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o
- 25 (iv) una cualquiera de las reivindicaciones 6(G) o 7(iii), en las que el aumento de la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP aumentada; o
- 30 (v) una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6(I), 6(J) o 7(iv), en las que la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada.
- 35 9. Células bacterianas recombinantes capaces de dar una producción aumentada de isoprenoides en las que las células se modifican por ingeniería genética mediante modulación de la actividad citrato sintasa para lograr un flujo aumentado de carbono hacia la producción de mevalonato, de manera que la actividad de citrato sintasa se disminuye, y en las que la actividad de las siguientes enzimas:
- 40 (a) fosfotransacetilasa
- (b) acetato cinasa, y
- 45 (c) lactato deshidrogenasa,
- se modula,
- y en las que opcionalmente la actividad de una o más enzimas del grupo:
- 50 (d) malato deshidrogenasa,
- (e) piruvato deshidrogenasa
- 55 (f) fosfogluconolactonasa (PGL), y
- (g) fosfoenolpiruvato carboxilasa
- 60 se modula, y en las que dichas células comprenden además (i) uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de mevalonato (MVA) y (ii) uno o más ácidos nucleicos que codifican poliprenil pirofosfato sintasas; y en las que las células producen cantidades aumentadas de isoprenoides en comparación con células productoras de isoprenoides que no se han modificado por ingeniería genética para lograr un flujo aumentado de carbono hacia mevalonato.
- 65 10. Células bacterianas según la reivindicación 9,

- 5 (A) en las que el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA superior, en las que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA superior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de AA-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa, en las que opcionalmente dichos uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la ruta de mevalonato (MVA) superior son un gen *mvaE* y un gen *mvaS*, y en las que además opcionalmente el gen *mvaE* y el gen *mvaS* se seleccionan del grupo que consiste en:
- 10 (a) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *L. grayi*; (b) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecium*; (c) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. gallinarum*; (d) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. casseliflavus*; y (e) un gen *mvaE* y un gen *mvaS* de *E. faecalis*; o
- 15 (B) en las que el uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la ruta de MVA son de la ruta de MVA inferior, en las que los ácidos nucleicos de la ruta de MVA inferior se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos de MVK, PMK y MVD, en las que opcionalmente la MVK se selecciona del grupo que consiste en mevalonato cinasa de *M. mazei*, polipéptido de mevalonato cinasa de *M. burtonii*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Lactobacillus sakei*, polipéptido de mevalonato cinasa de levadura, polipéptido de mevalonato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptococcus pneumoniae*, polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* y polipéptido de mevalonato cinasa de *Streptomyces* CL190; o
- 20 (C) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos de la ruta de DXP; o
- 25 (D) en las que las células son células bacterianas Gram-positivas, células de *Streptomyces*, células bacterianas Gram-negativas, células de *Escherichia* o células de *Pantoea*; o
- 30 (E) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye por reemplazo cromosómico de un gen de citrato sintasa endógeno por un transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH, en las que opcionalmente el transgén que codifica una citrato sintasa insensible a NADH deriva de *Bacillus subtilis*; o
- 35 (F) en las que la actividad de citrato sintasa se disminuye reemplazando el promotor del gen de citrato sintasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético; o
- 40 (G) en las que la actividad de fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o un gen de acetato cinasa endógeno, en las que la expresión del gen de acetato cinasa y/o fosfotransacetilasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno; o
- 45 (H) en las que la actividad de lactato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de lactato deshidrogenasa endógeno, en las que la expresión del gen de lactato deshidrogenasa endógeno se atenúa mediante delección del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o
- 50 (I) en las que la malato deshidrogenasa es una malato deshidrogenasa dependiente de NADP y en las que la actividad de la malato deshidrogenasa dependiente de NADP se modula aumentando la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP, en las que el gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP es un gen endógeno, y en las que la expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno se aumenta reemplazando el promotor del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP endógeno por un promotor de expresión constitutiva sintético; o
- 55 (J) en las que las células comprenden además un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido de malato deshidrogenasa dependiente de NADP; o
- 60 (K) en las que la actividad de piruvato deshidrogenasa se modula aumentando la actividad de uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa y en las que la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se modula atenuando la actividad de un gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno, en las que el uno o más genes del complejo de piruvato deshidrogenasa son genes endógenos, y en las que la expresión del uno o más genes endógenos del complejo de piruvato deshidrogenasa se aumenta reemplazando uno o más promotores de genes endógenos por uno o más promotores de expresión constitutiva sintéticos; o
- 65 (L) en las que las células comprenden además uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos del complejo de piruvato deshidrogenasa del grupo que consiste en (a) piruvato deshidrogenasa (E1), (b) dihidrolipoil transacetilasa y (c) dihidrolipoil deshidrogenasa, en las que opcionalmente la actividad de un represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno se atenúa

mediante delección del gen de represor del complejo de piruvato deshidrogenasa endógeno; o

(M) en las que la actividad de PGL se modula atenuando la actividad de un gen de PGL endógeno, en las que la actividad de PGL se disminuye reemplazando el promotor del gen de PGL endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, en las que la actividad de una PGL endógena se atenúa mediante delección del gen de PGL endógeno; o

(N) en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se modula atenuando la actividad de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno, en las que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa se disminuye reemplazando el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno por un promotor de baja expresión de manera constitutiva sintético, y en las que la actividad de una fosfoenolpiruvato carboxilasa endógena se atenúa mediante delección del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa endógeno; u

(O) que comprende además uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de difosfato de isopentenilo delta-isomerasa (IDI).

11. Células bacterianas según

(i) la reivindicación 9 o la reivindicación 10(G), en las que las células producen cantidades disminuidas de acetato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o

(ii) una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10(H), en las que las células producen cantidades disminuidas de lactato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

(iii) la reivindicación 10(I), en las que las células producen cantidades aumentadas de piruvato en comparación con microorganismos que no tienen expresión aumentada de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP; o

(iv) una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10(K) o 10(L), en las que las células producen cantidades aumentadas de acetil Co-A en comparación con microorganismos en los que la actividad de piruvato deshidrogenasa no se modula.

12. Células bacterianas según

(i) una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10(E) o 10(F), en las que la disminución de la actividad de citrato sintasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión disminuida de citrato sintasa; o

(ii) una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10(A), 10(B), 10(C), 10(D), 10(G) u 11(i), en las que la atenuación de la actividad del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o el gen de acetato cinasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de fosfotransacetilasa endógeno y/o gen de acetato cinasa endógeno; o

(iii) una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10(H) u 11(ii), en las que la atenuación de la actividad del gen de lactato deshidrogenasa endógeno da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión atenuada del gen de lactato deshidrogenasa endógeno; o

(iv) una cualquiera de las reivindicaciones 10(1) u 11(iii), en las que el aumento de la actividad de un gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión del gen de malato deshidrogenasa dependiente de NADP aumentada; o

(v) una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10(K), 10(L) u 11(iv), en las que la modulación de la actividad de piruvato deshidrogenasa da como resultado más flujo de carbono a la ruta de biosíntesis dependiente de mevalonato en comparación con microorganismos que no tienen expresión de piruvato deshidrogenasa modulada.

13. Células bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en las que el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos, y politerpenos, en las que opcionalmente el isoprenoide es un sesquiterpeno, o en las que opcionalmente el isoprenoide se selecciona del grupo que consiste en abietadieno, careno, α -farneseno, β -farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, patchulol, β -

pineno, sabineno, γ -terpineno, terpindeno y valenceno.

14. Método de

5 (i) producción de isopreno, que comprende:

(a) cultivar las células bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en condiciones de cultivo adecuadas para la producción de isopreno; y (b) producir el isopreno; o

10 (ii) producción de mevalonato, que comprende:

(a) cultivar las células bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 en condiciones de cultivo adecuadas para la producción de mevalonato; y (b) producir el mevalonato; o

15 (iii) producción de isoprenoides, que comprende:

(a) cultivar las células bacterianas según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13 en condiciones de cultivo adecuadas para la producción de isoprenoides; y (b) producir los isoprenoides;

20 comprendiendo el método además opcionalmente (c) recuperar isopreno, mevalonato o isoprenoides, respectivamente.

Figura 1

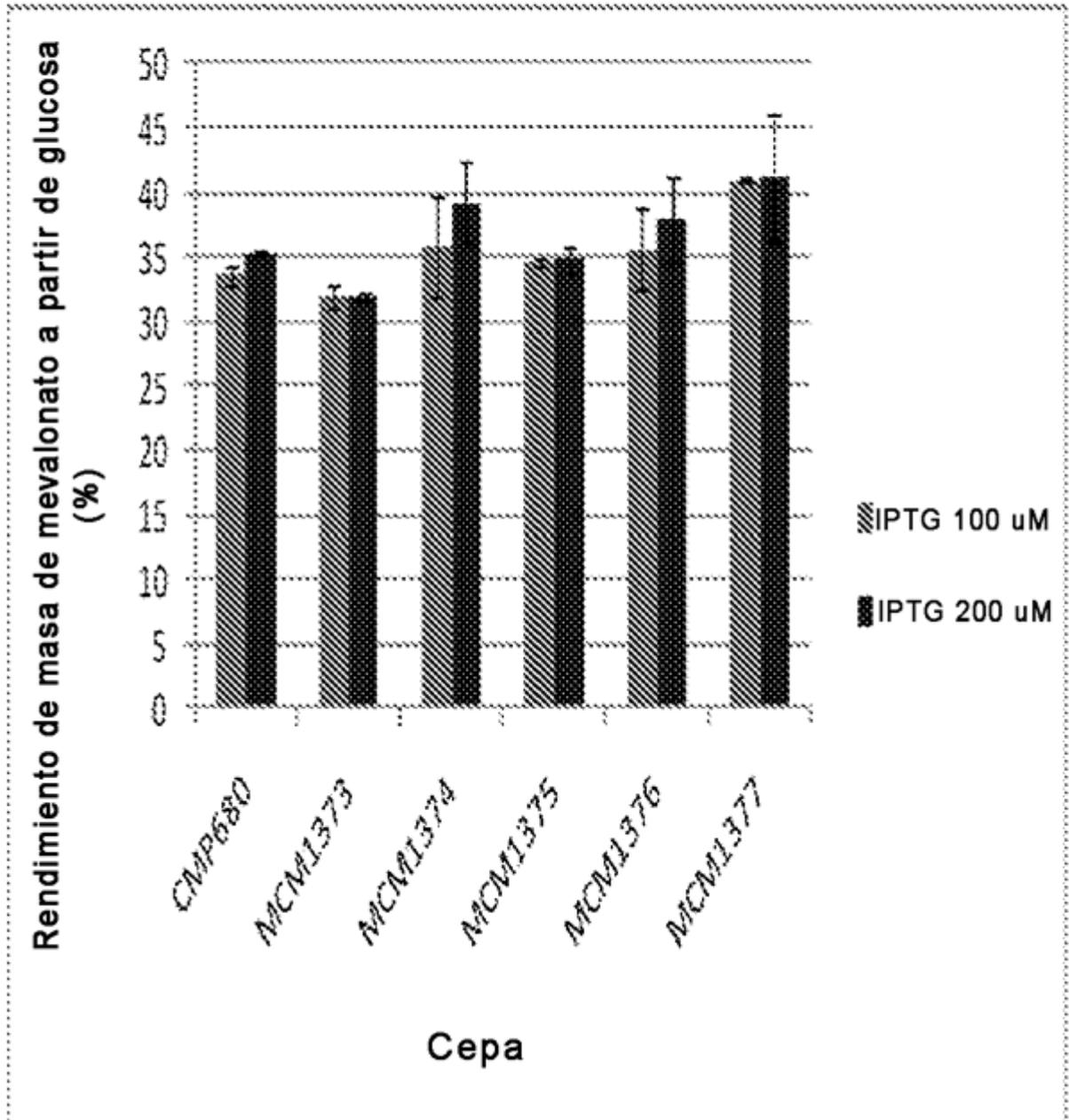


FIGURA 2:

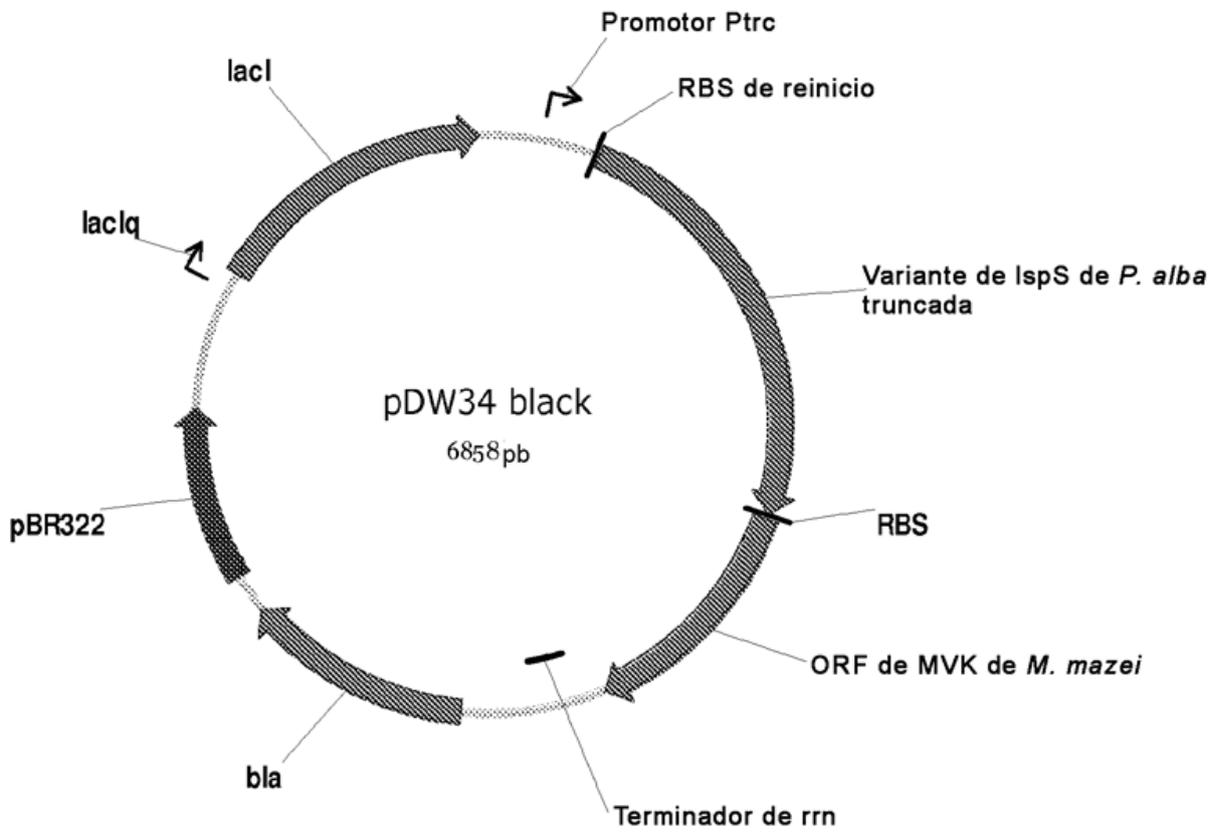


FIGURA 3:

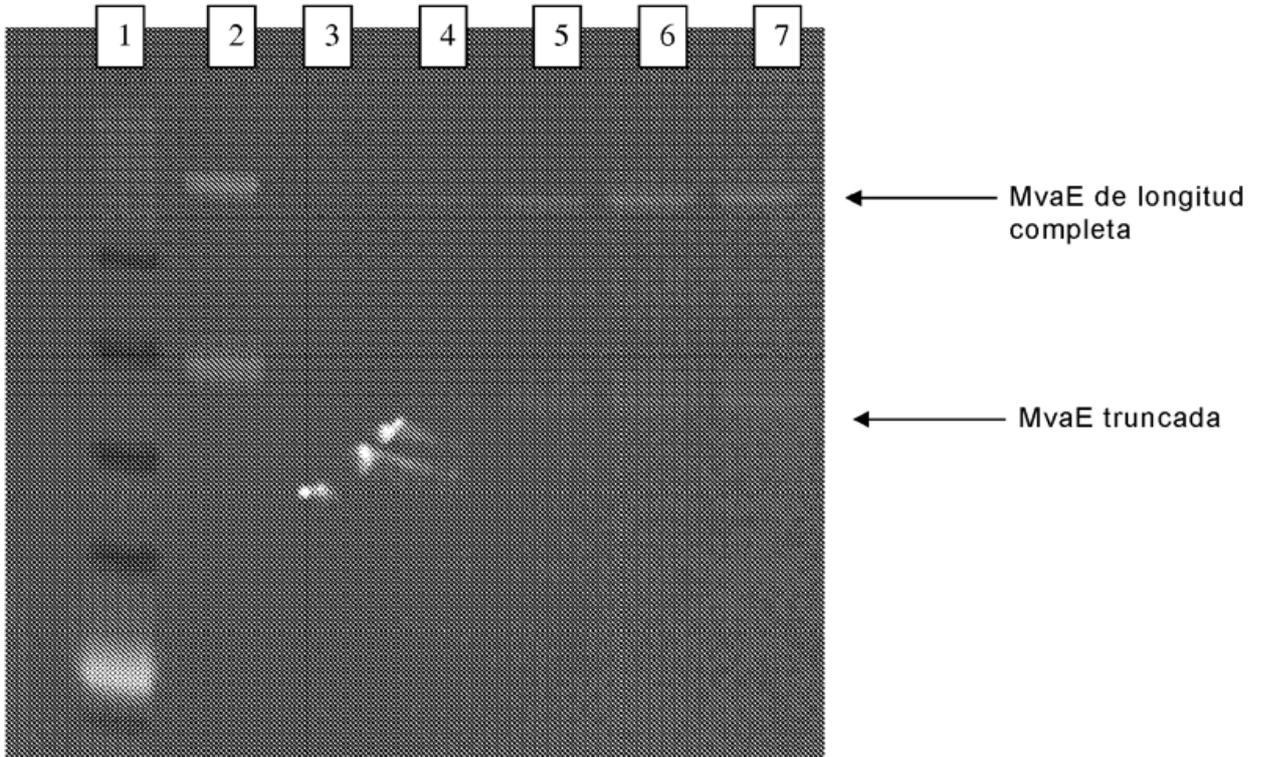


FIGURA 4:

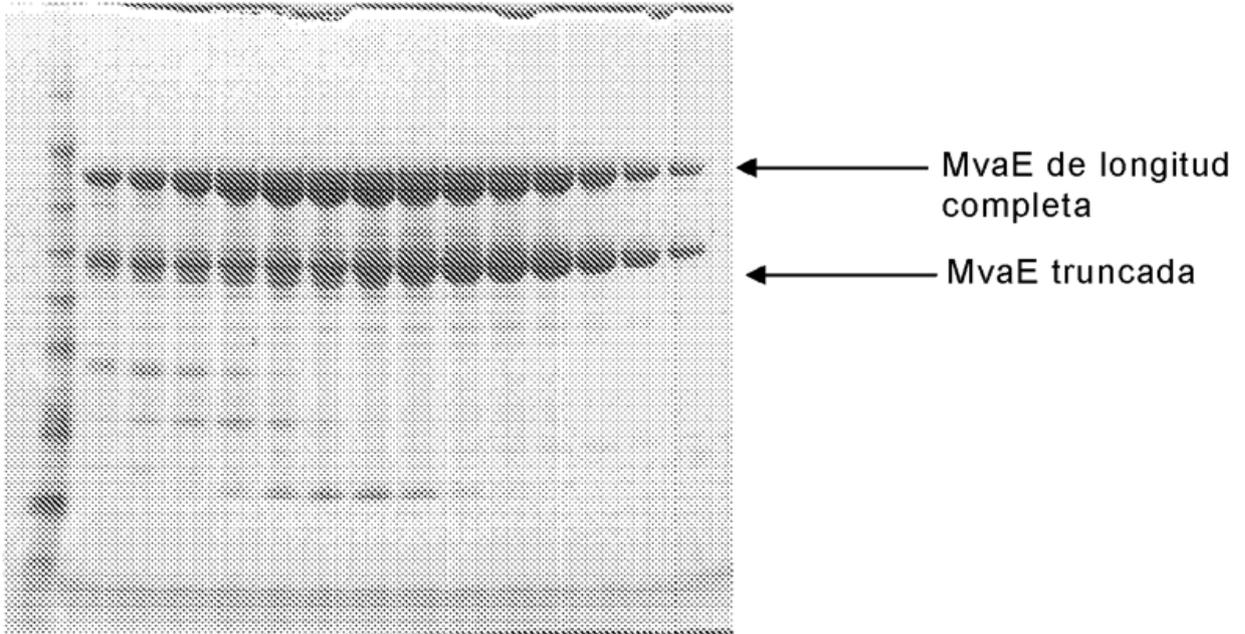


FIGURA 5:

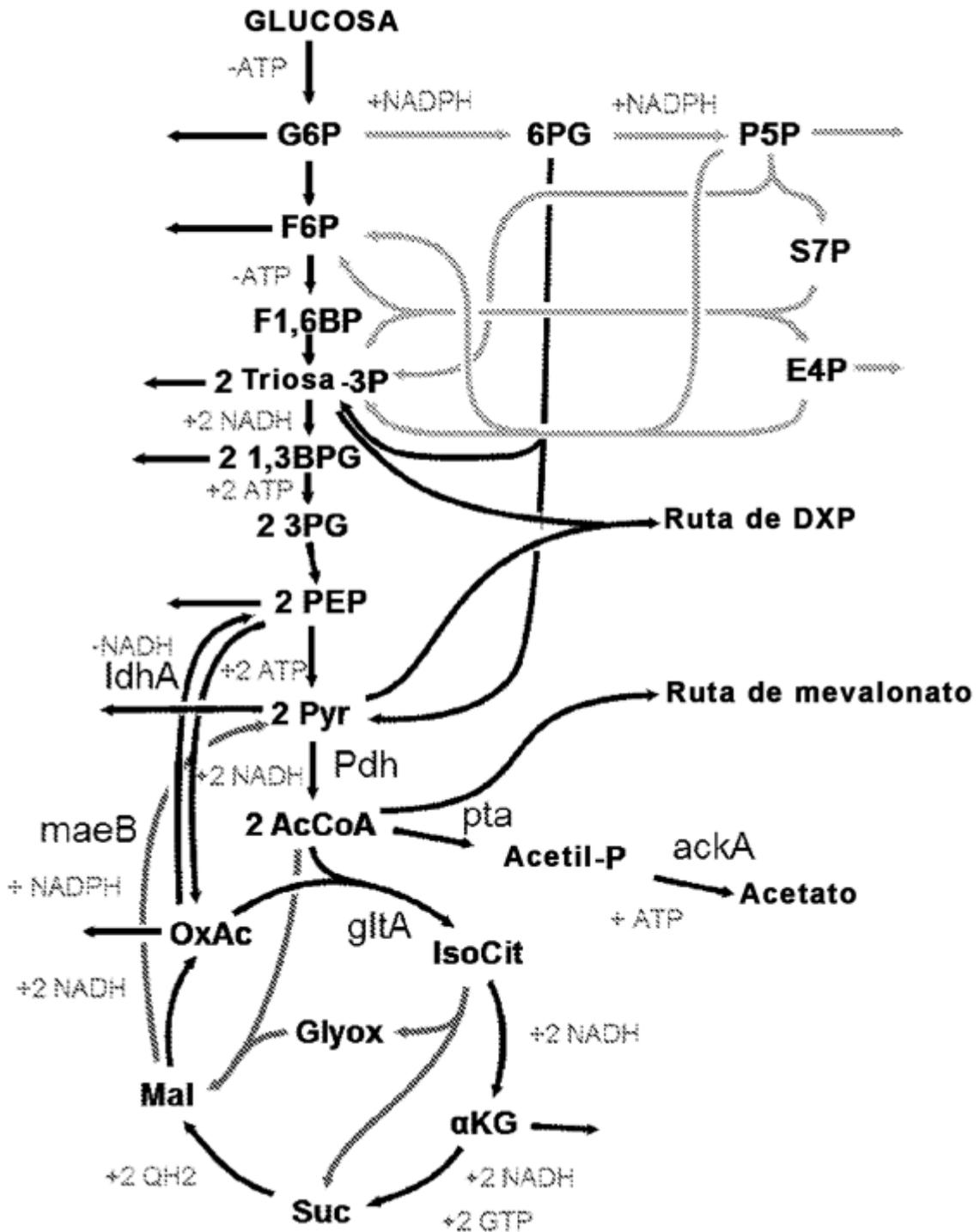


FIGURA 6:

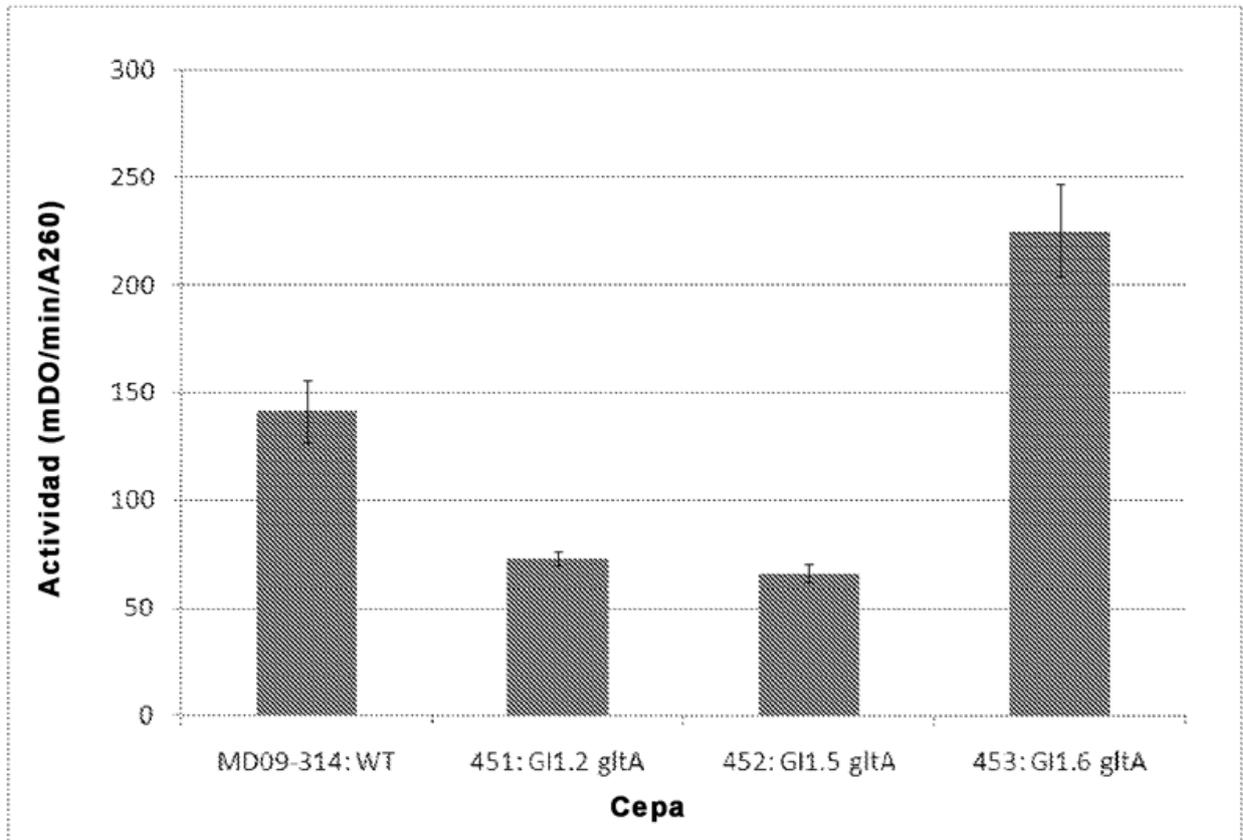


FIGURA 7:

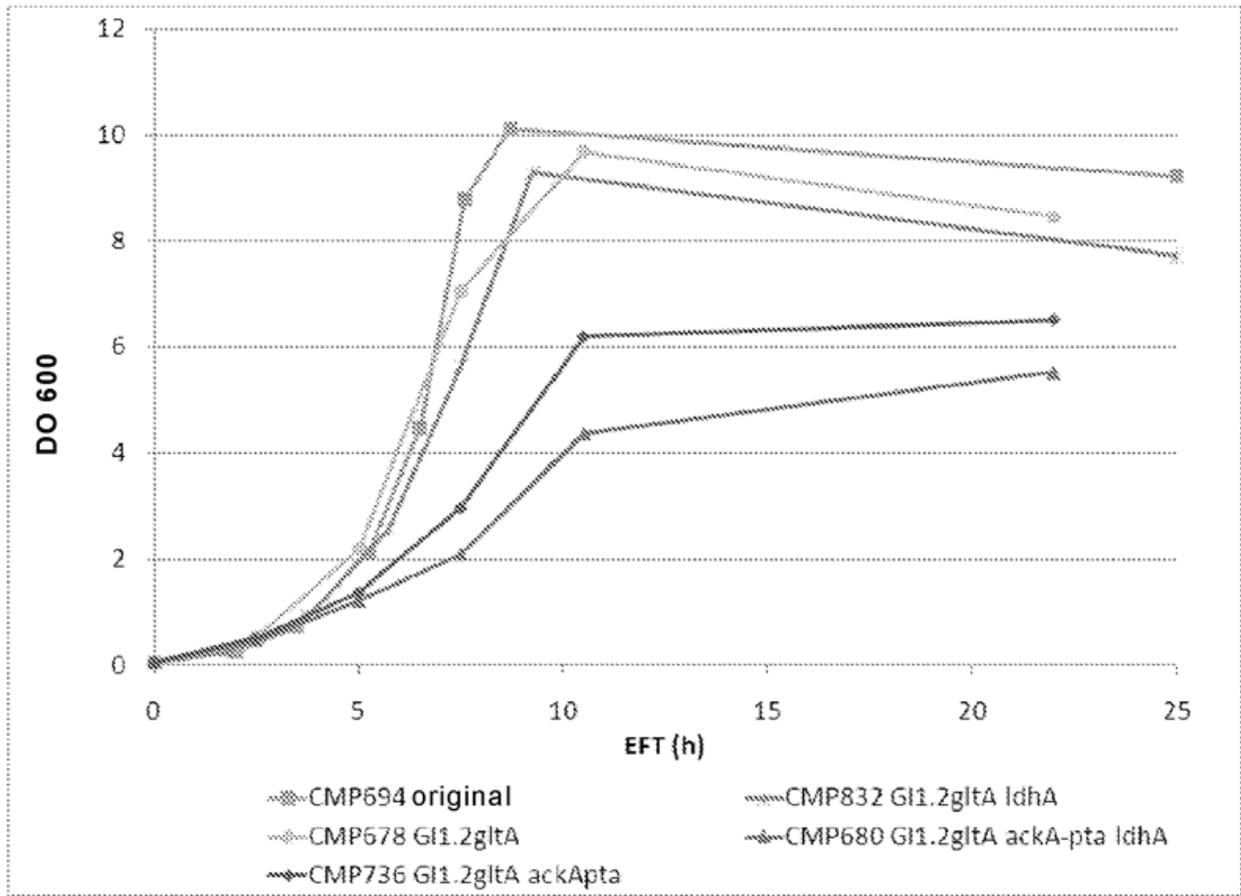


FIGURA 8:

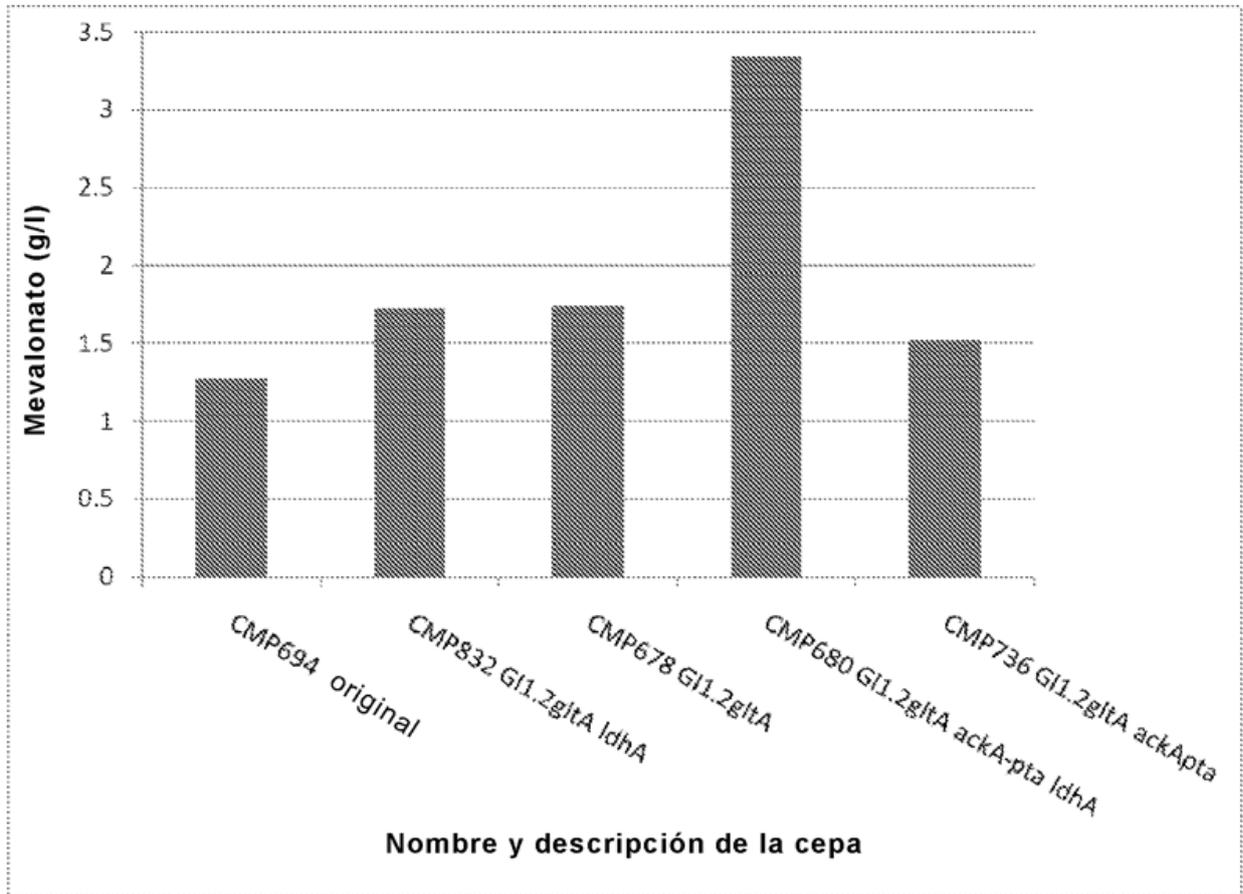


FIGURA 9:

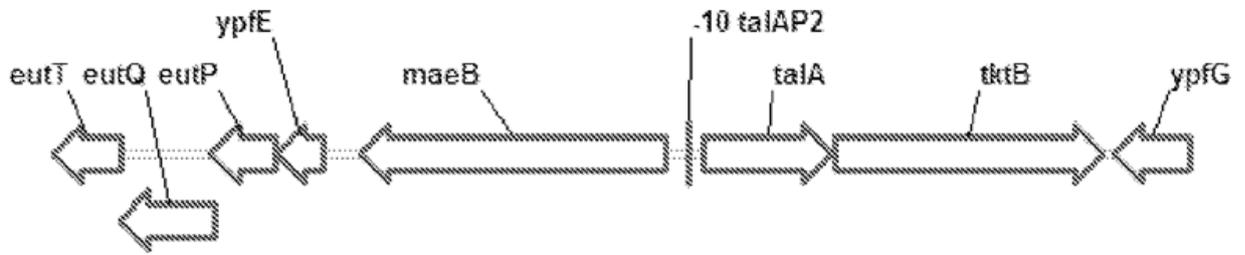


FIGURA 10:

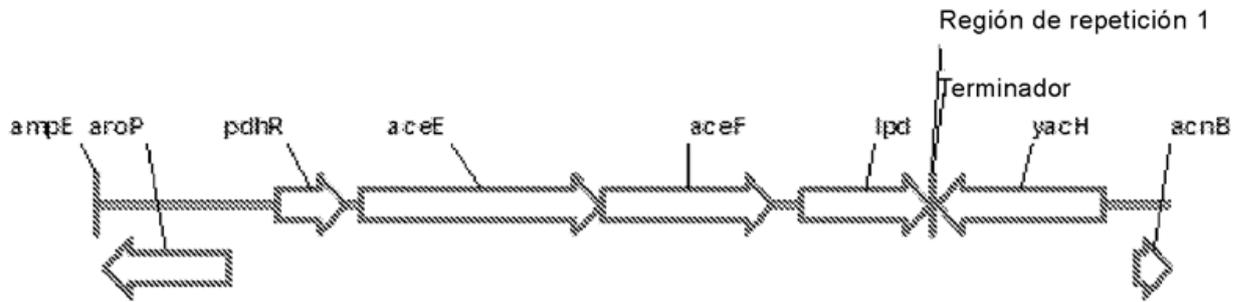
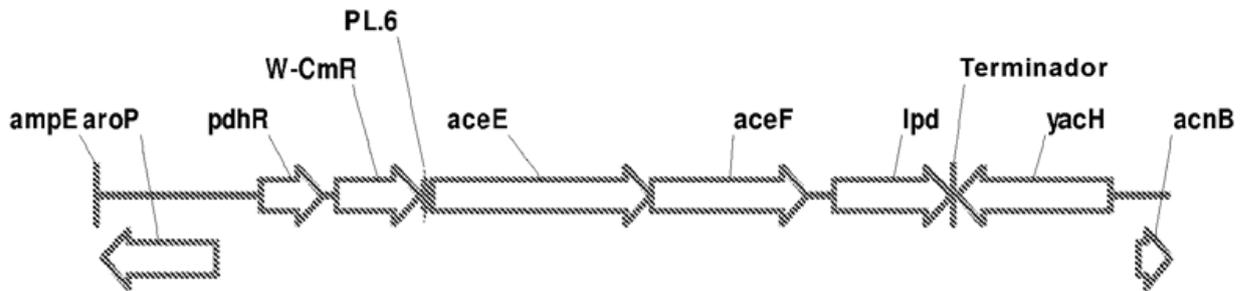


FIGURA 11:



Operón W-CmR-PL.6-pdh (aceE, aceF, lpd-Term)

13066 pb

FIGURA 12:

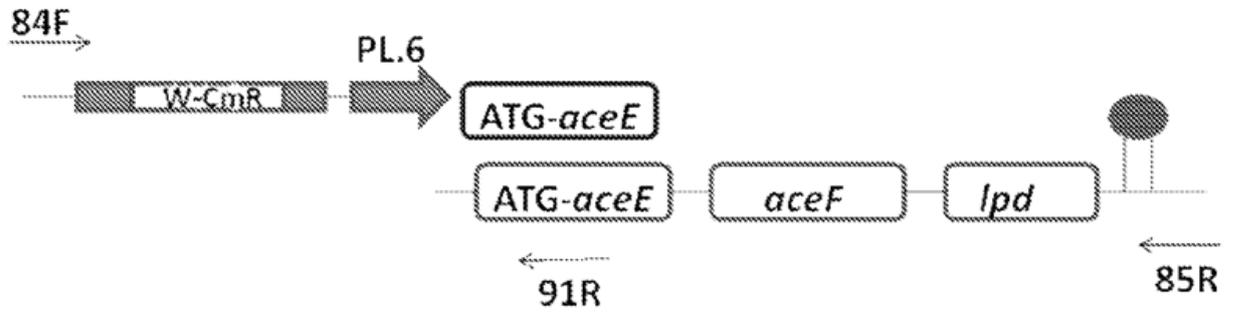


FIGURA 13:

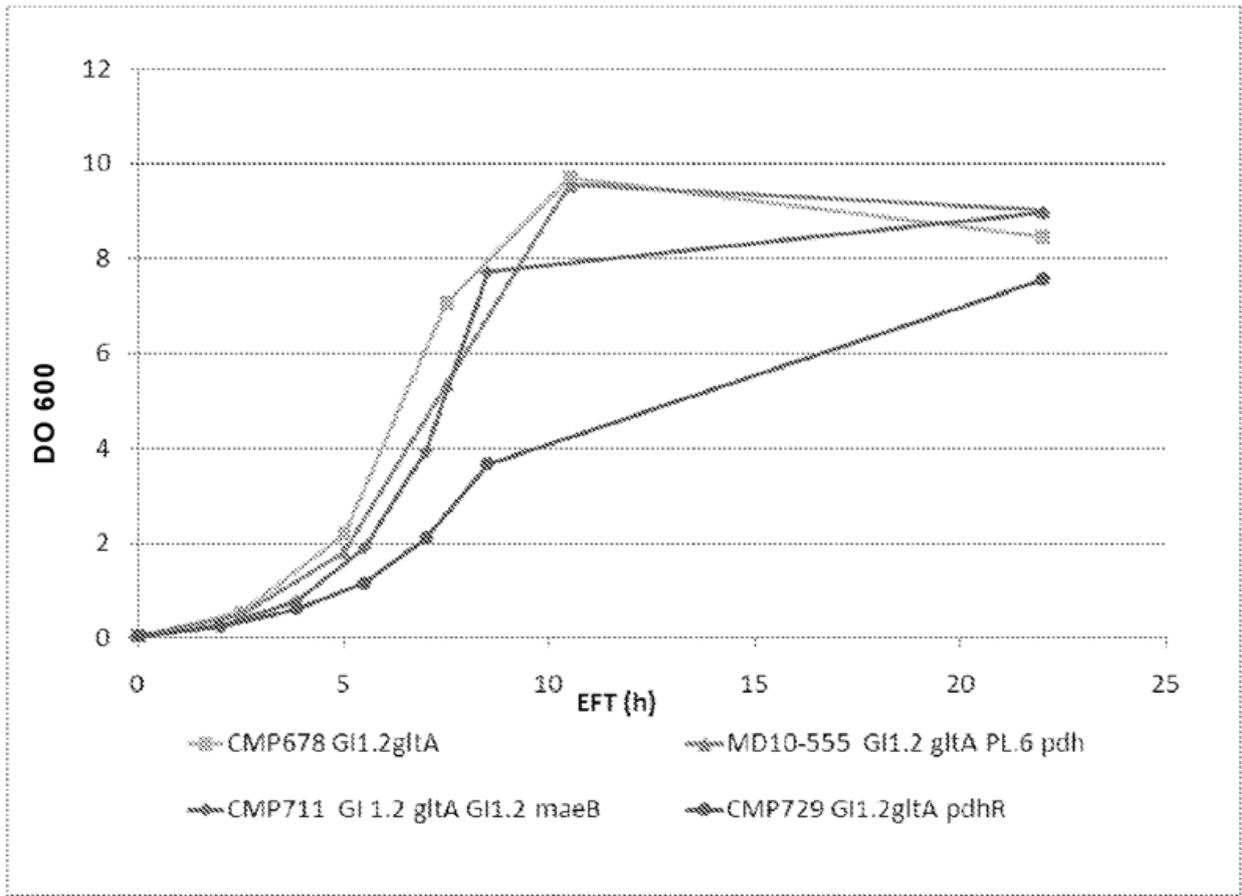


FIGURA 14:

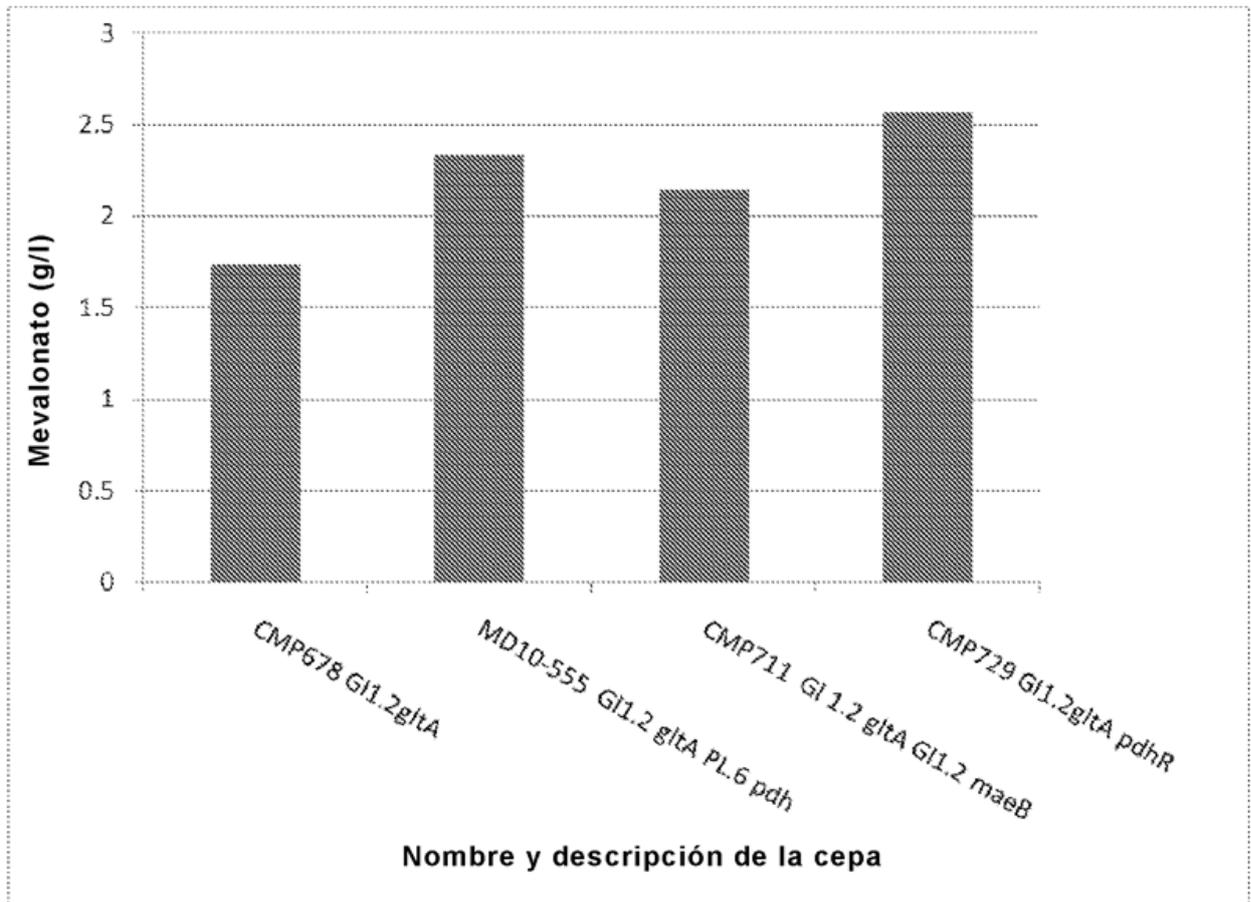


FIGURA 15:

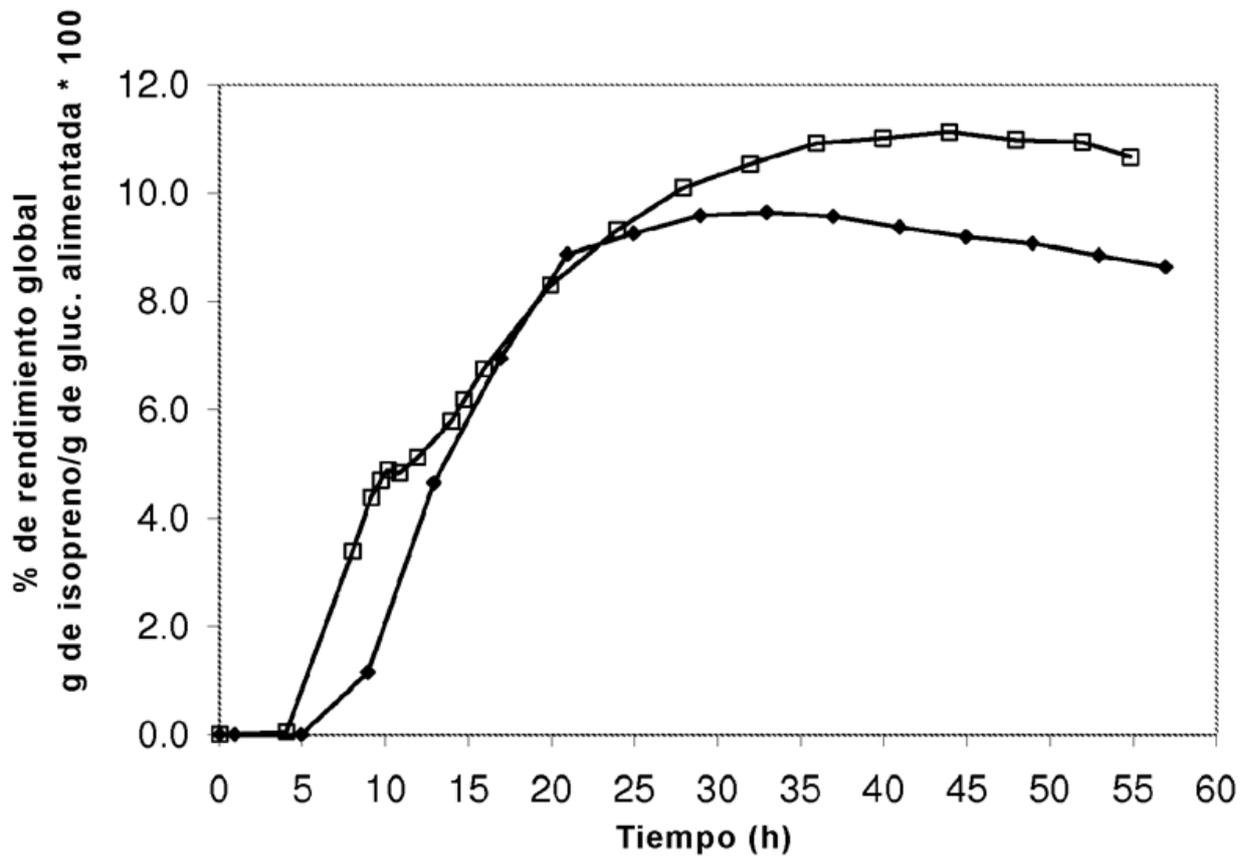


FIGURA 16:

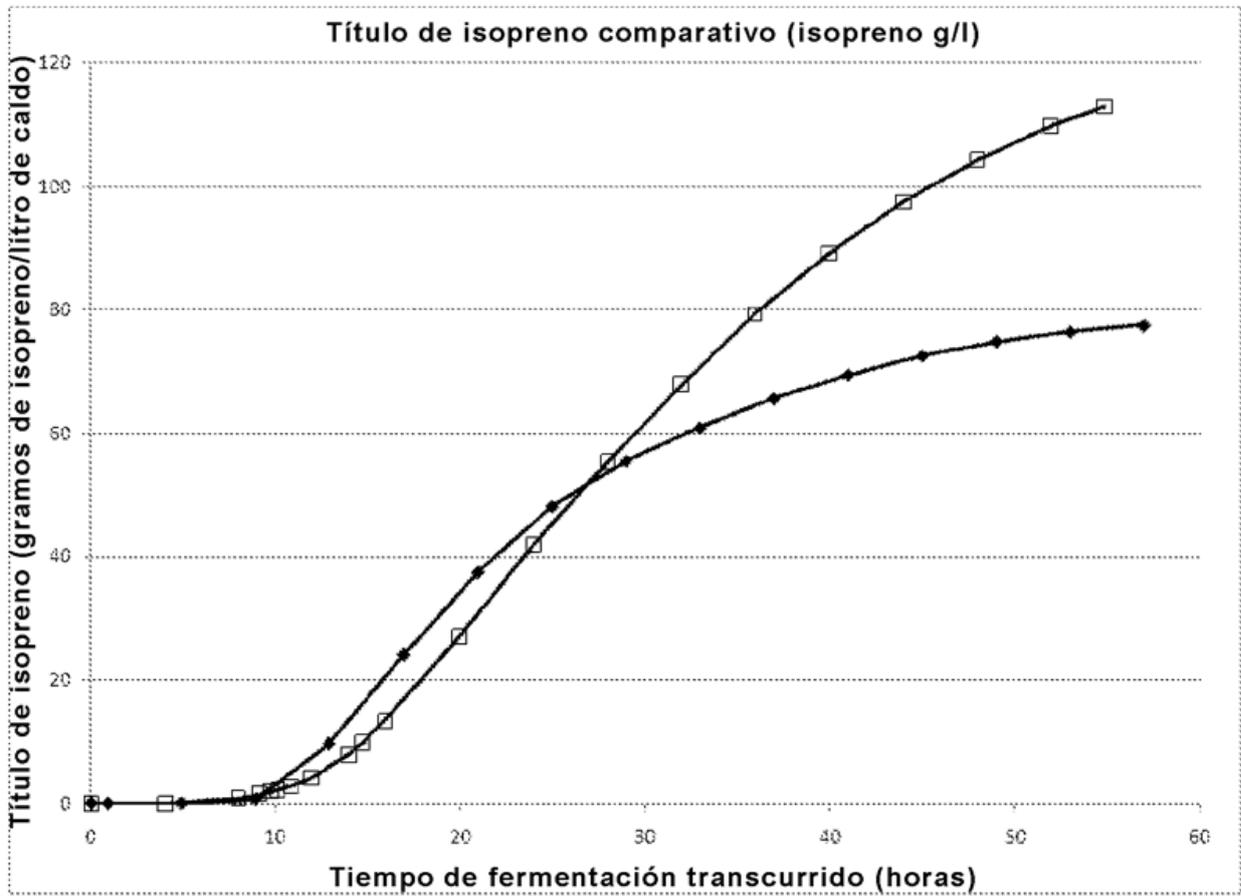


FIGURA 17:

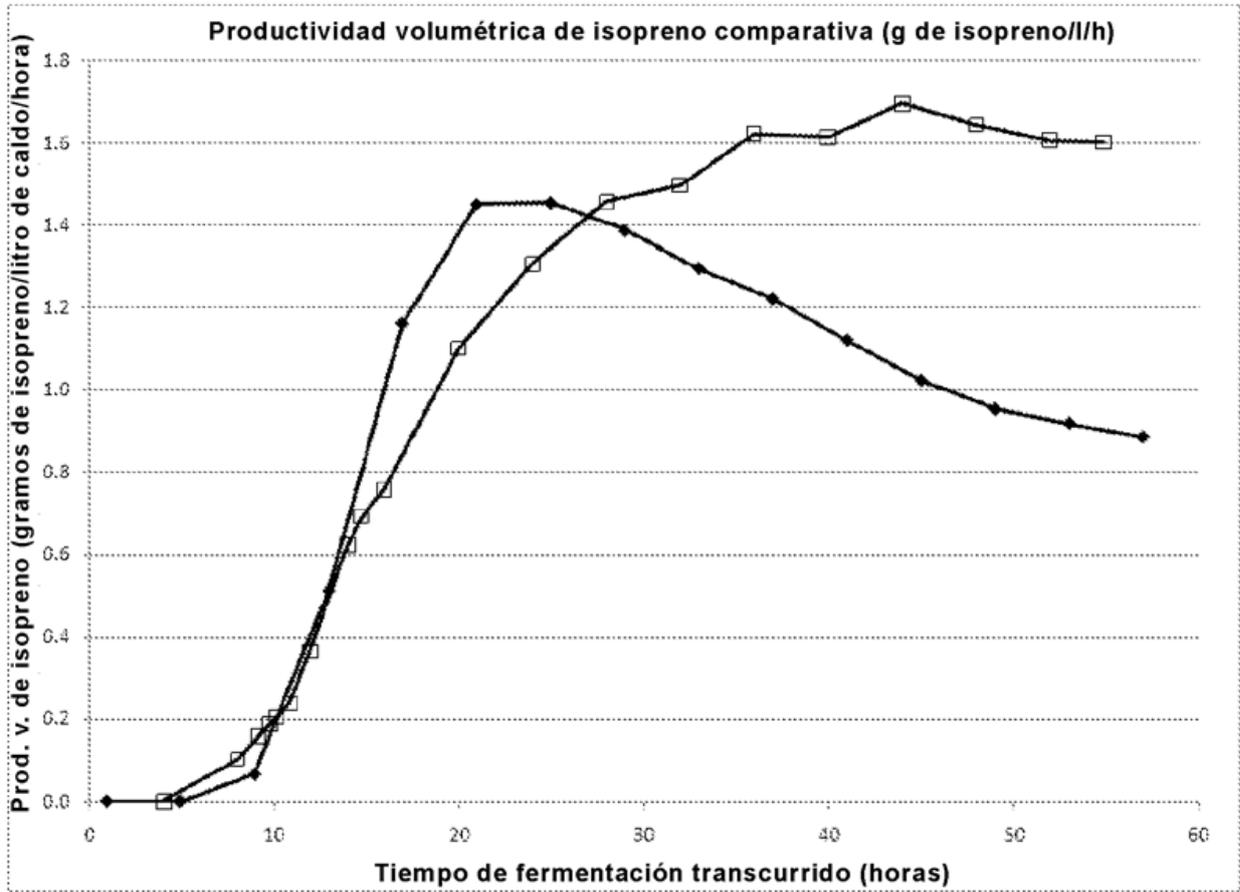


FIGURA 18:

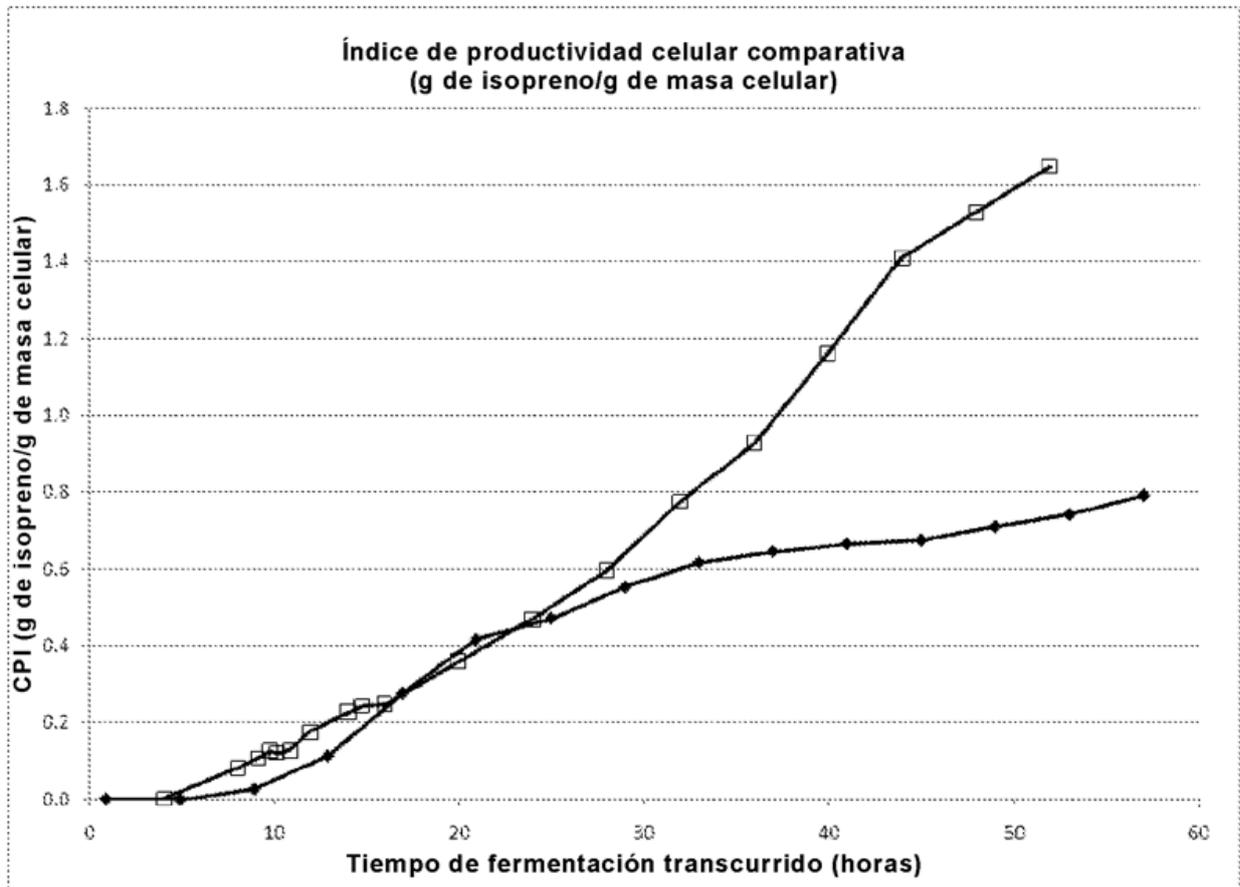


FIGURA 19:

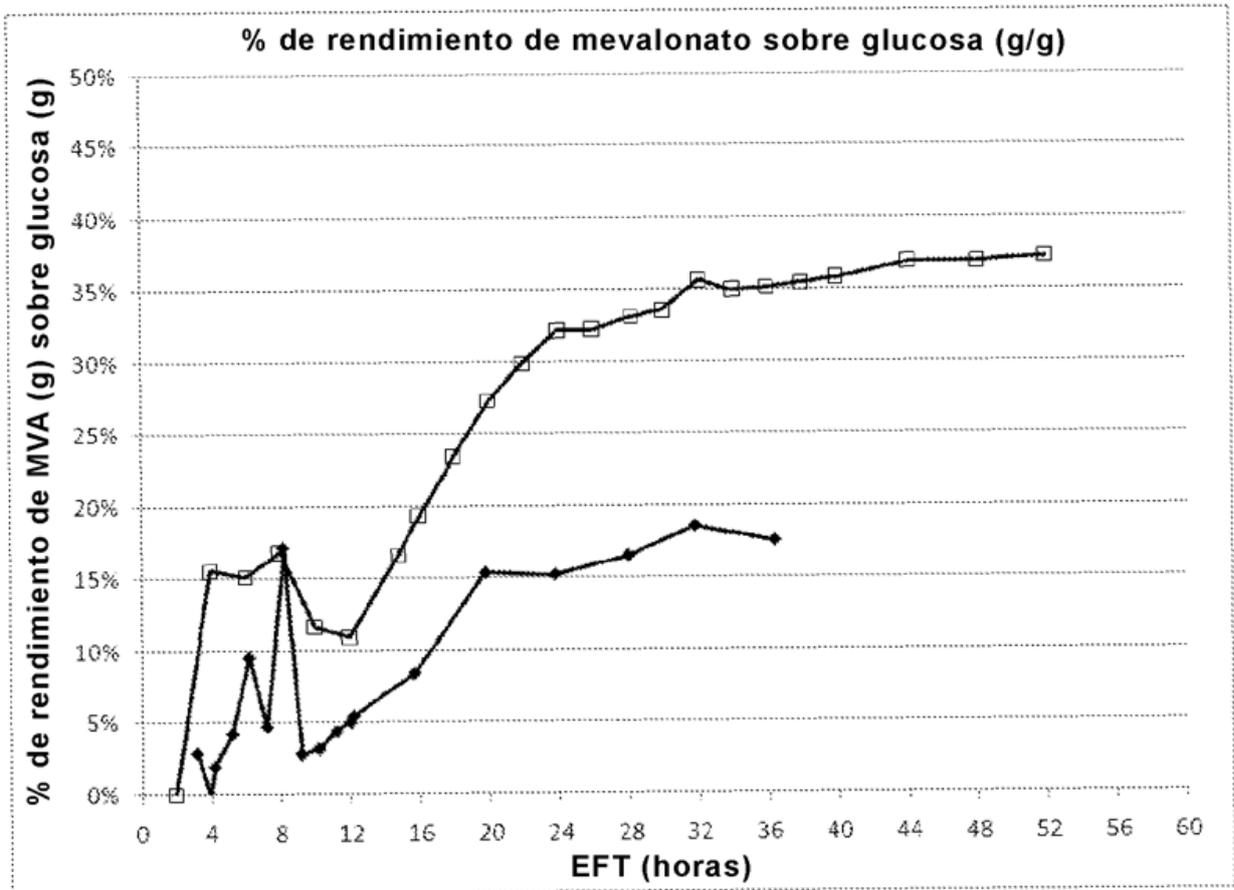


FIGURA 20:

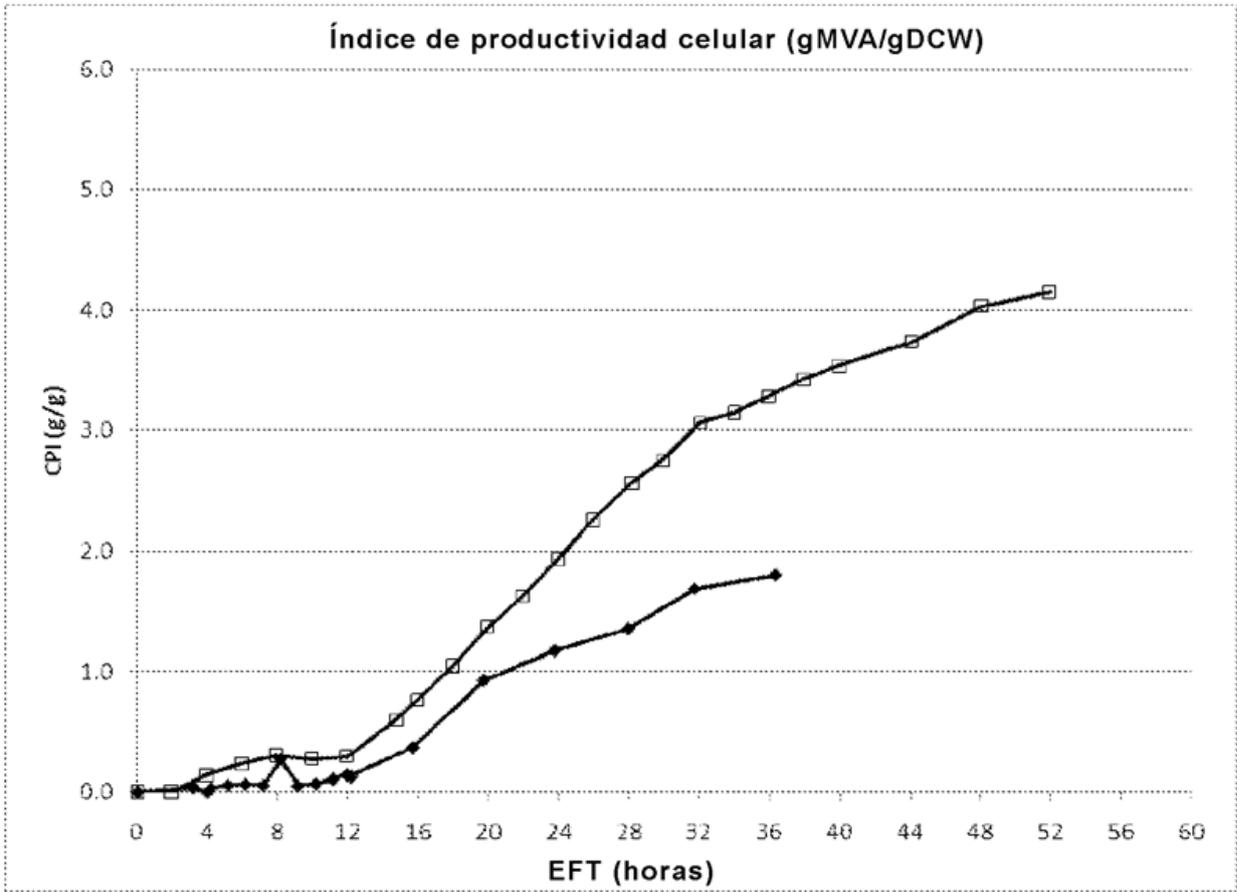


FIGURA 21:

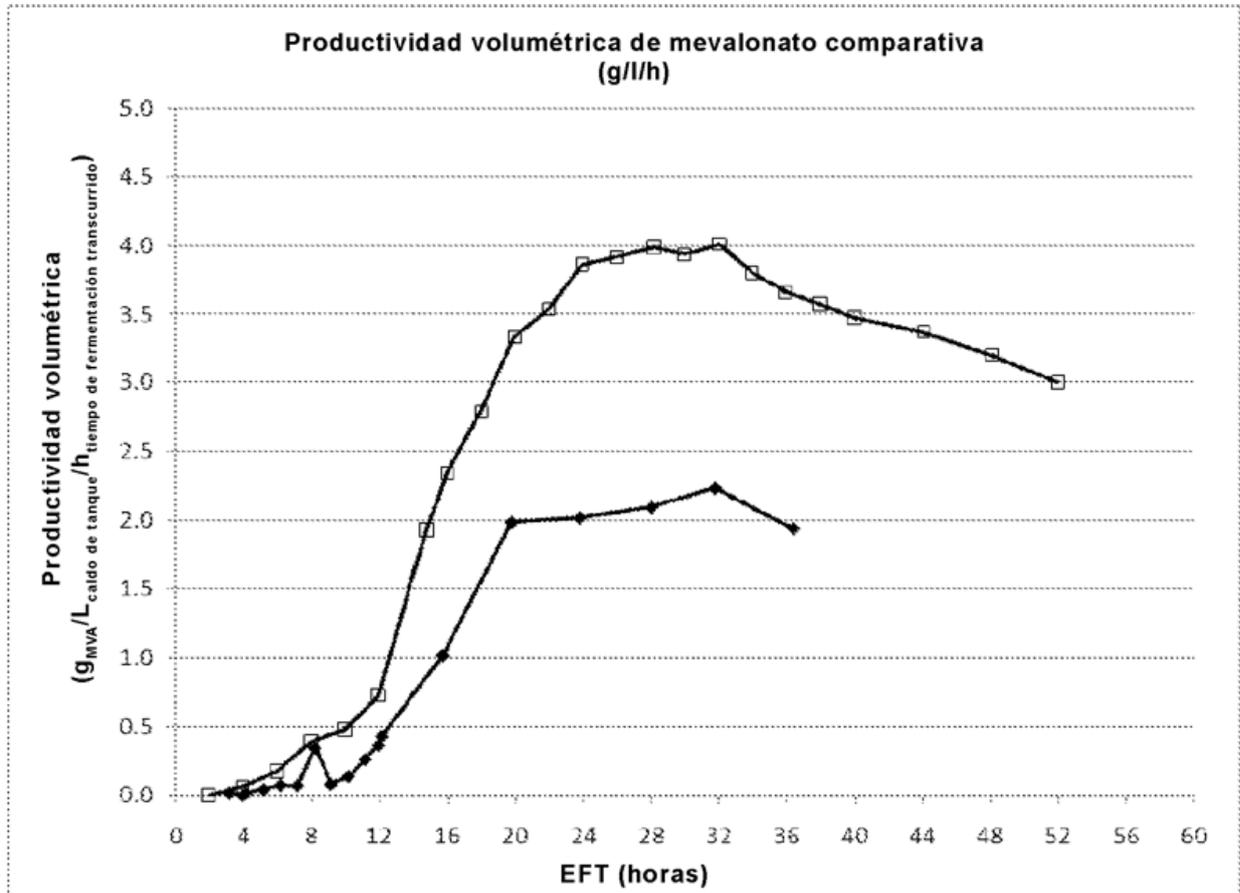


FIGURA 22:

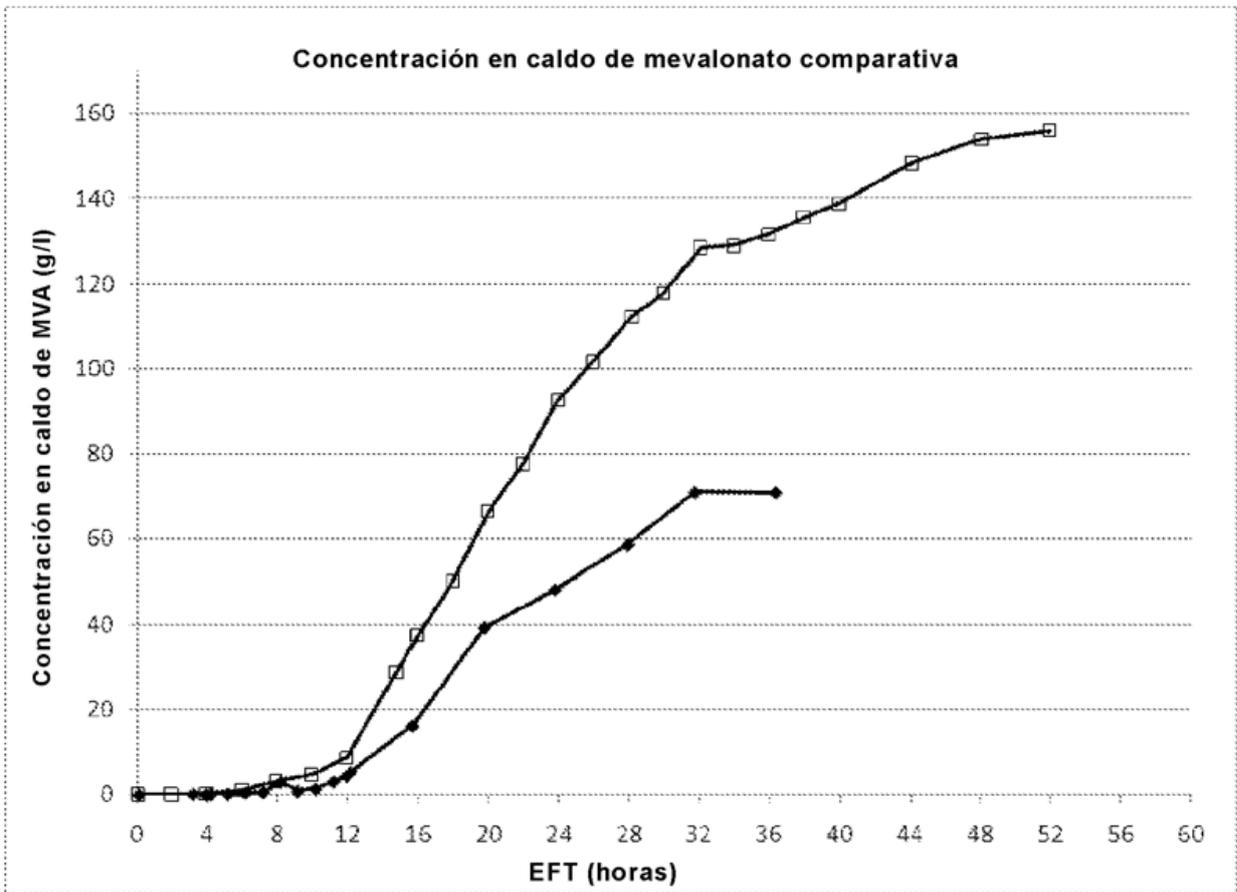


FIGURA 23:

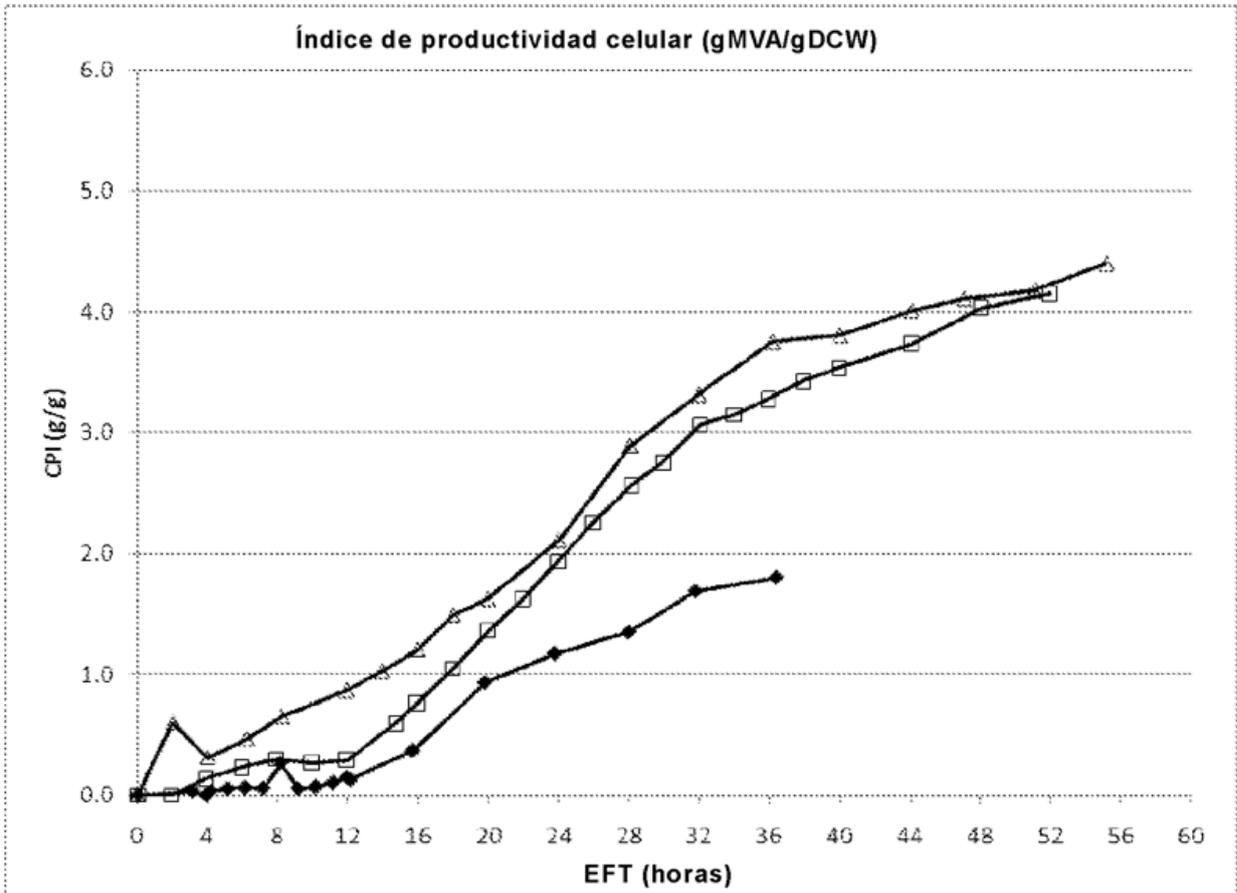


FIGURA 24:

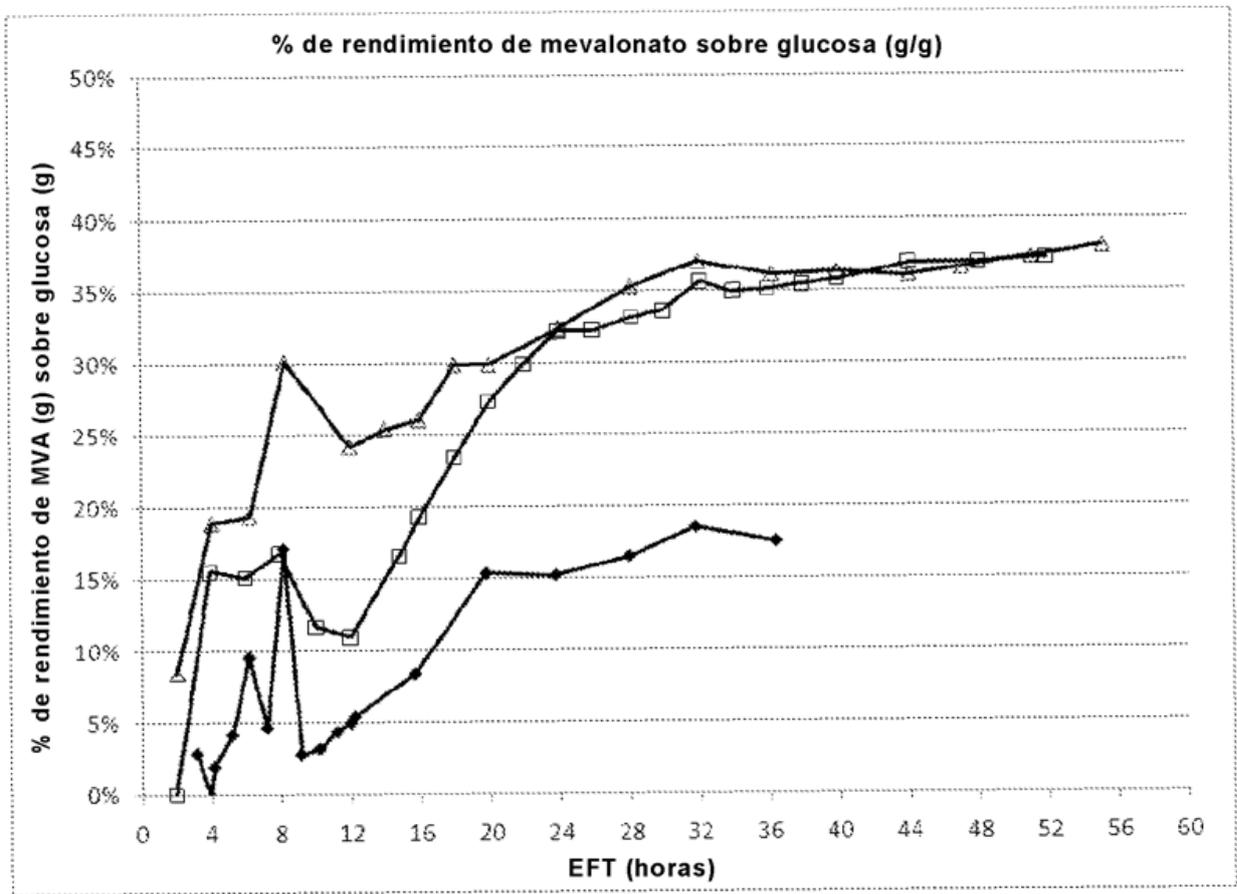


FIGURA 25:

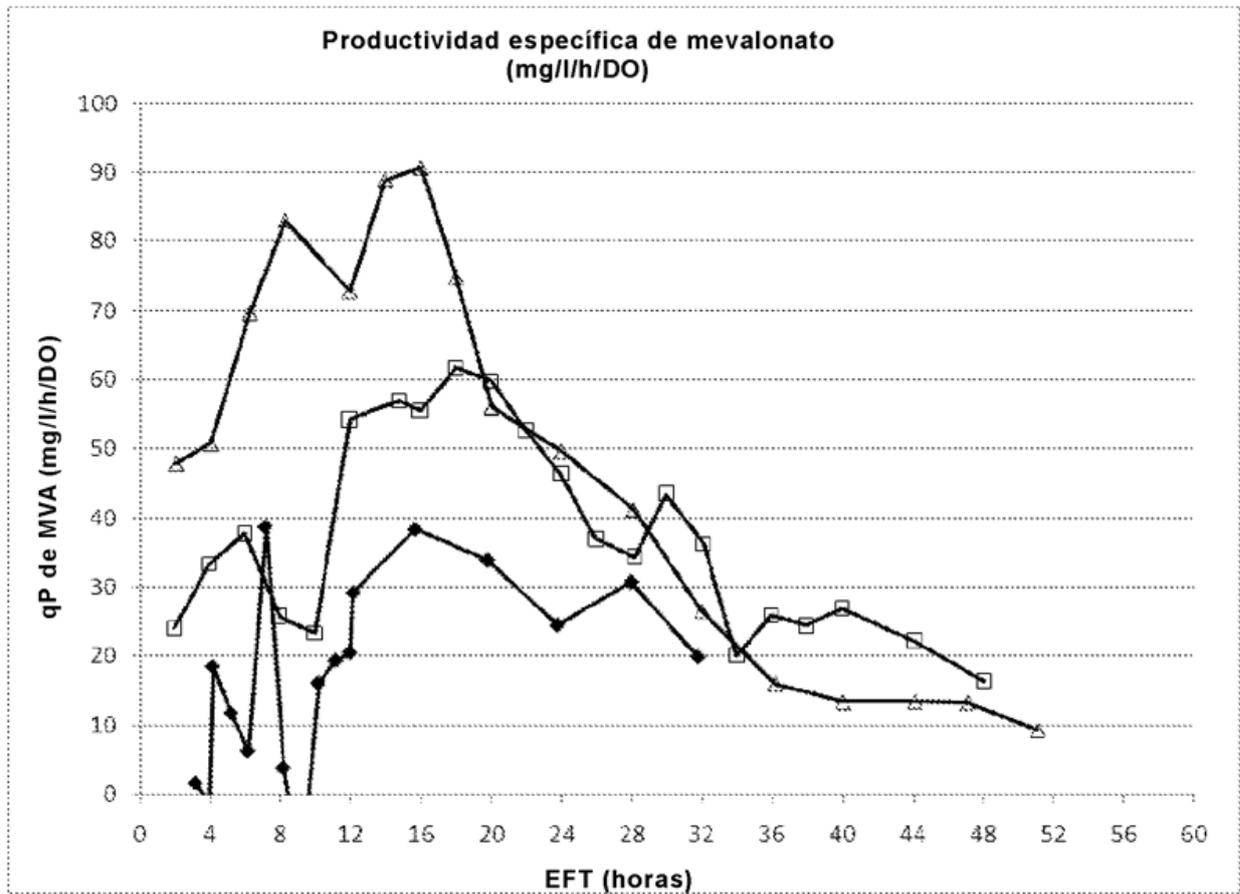


FIGURA 26:

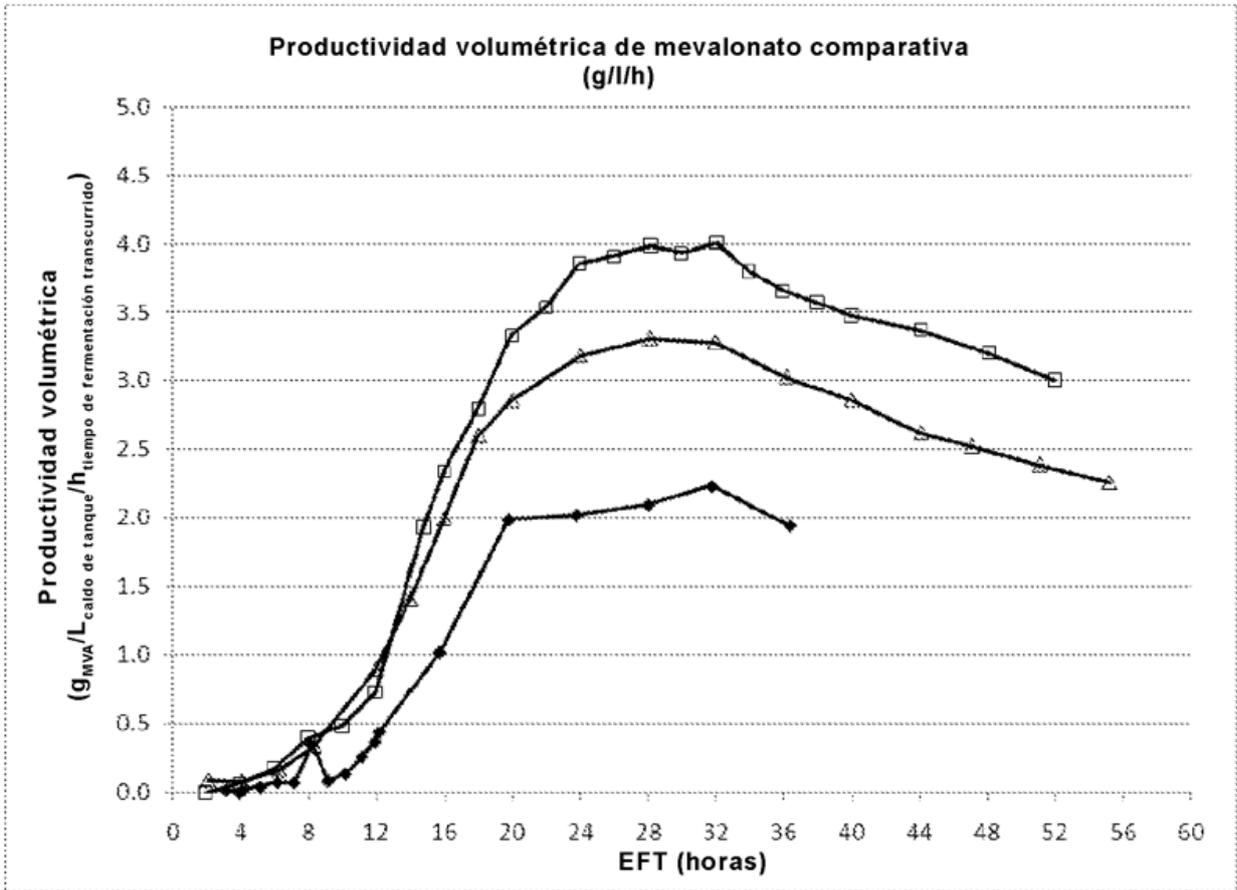


FIGURA 27:

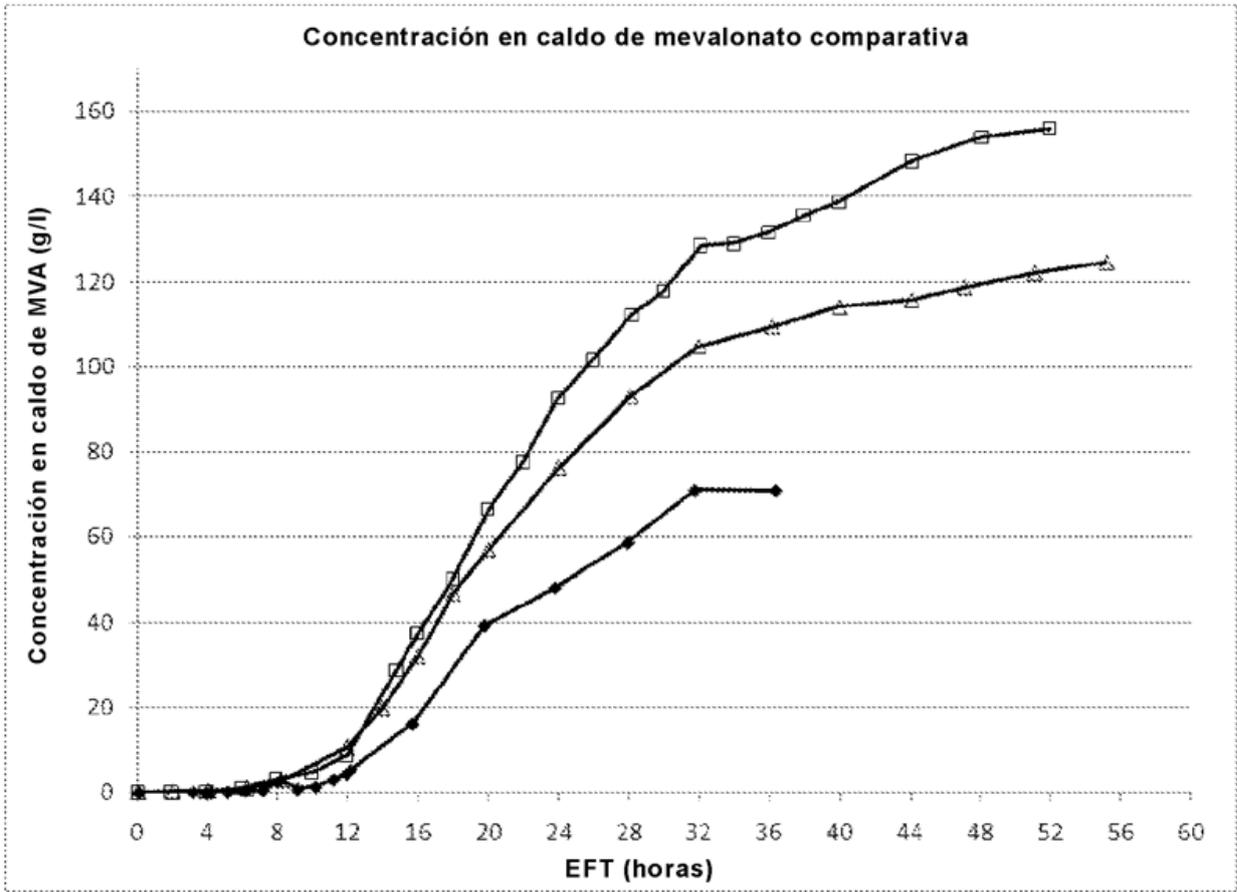


FIGURA 28:

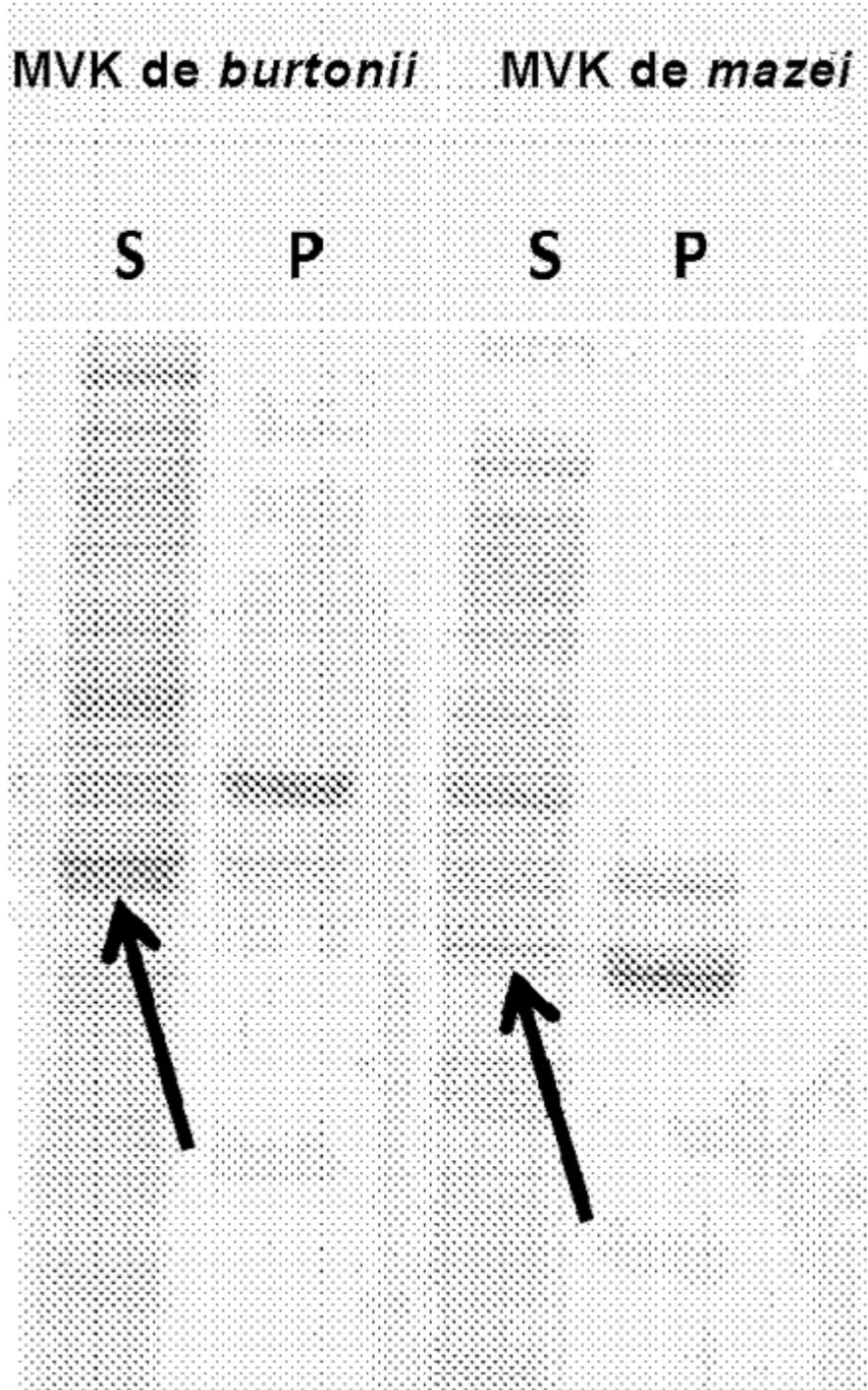


FIGURA 29:

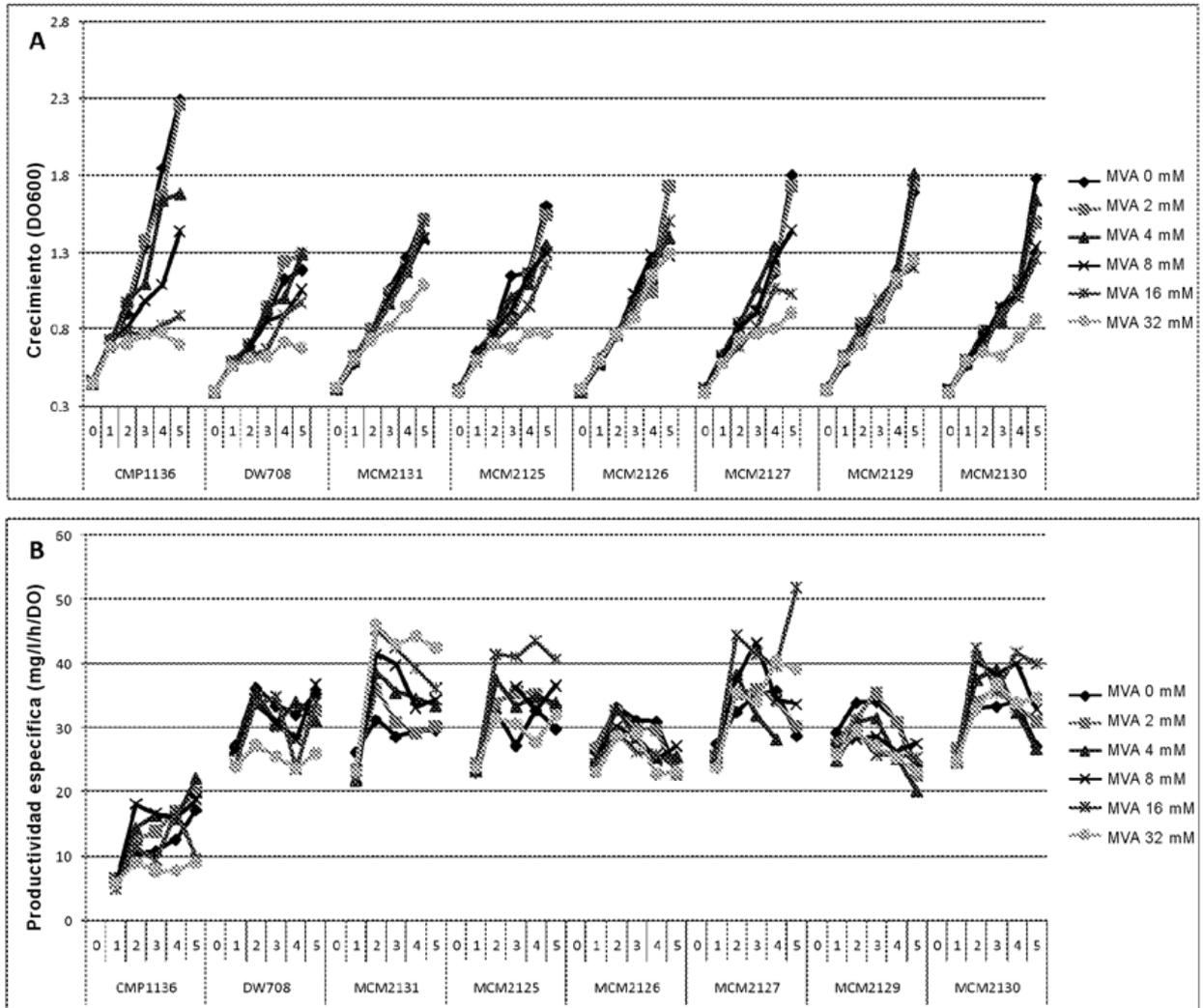


FIGURA 30:

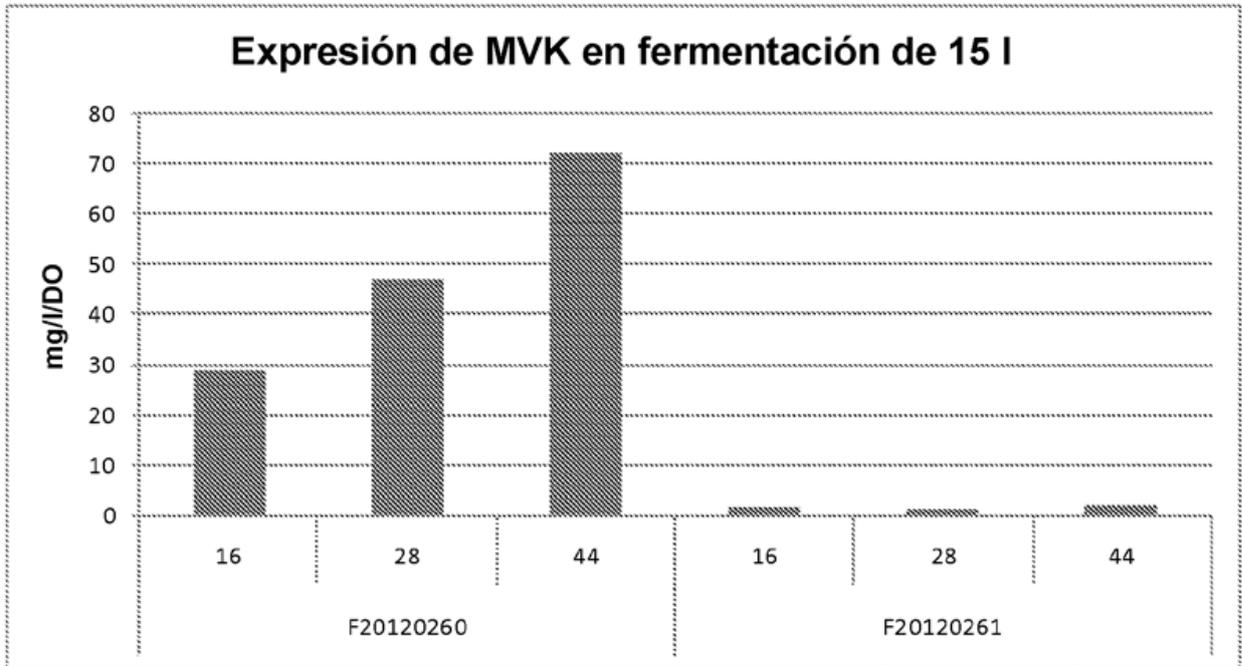


FIGURA 31:

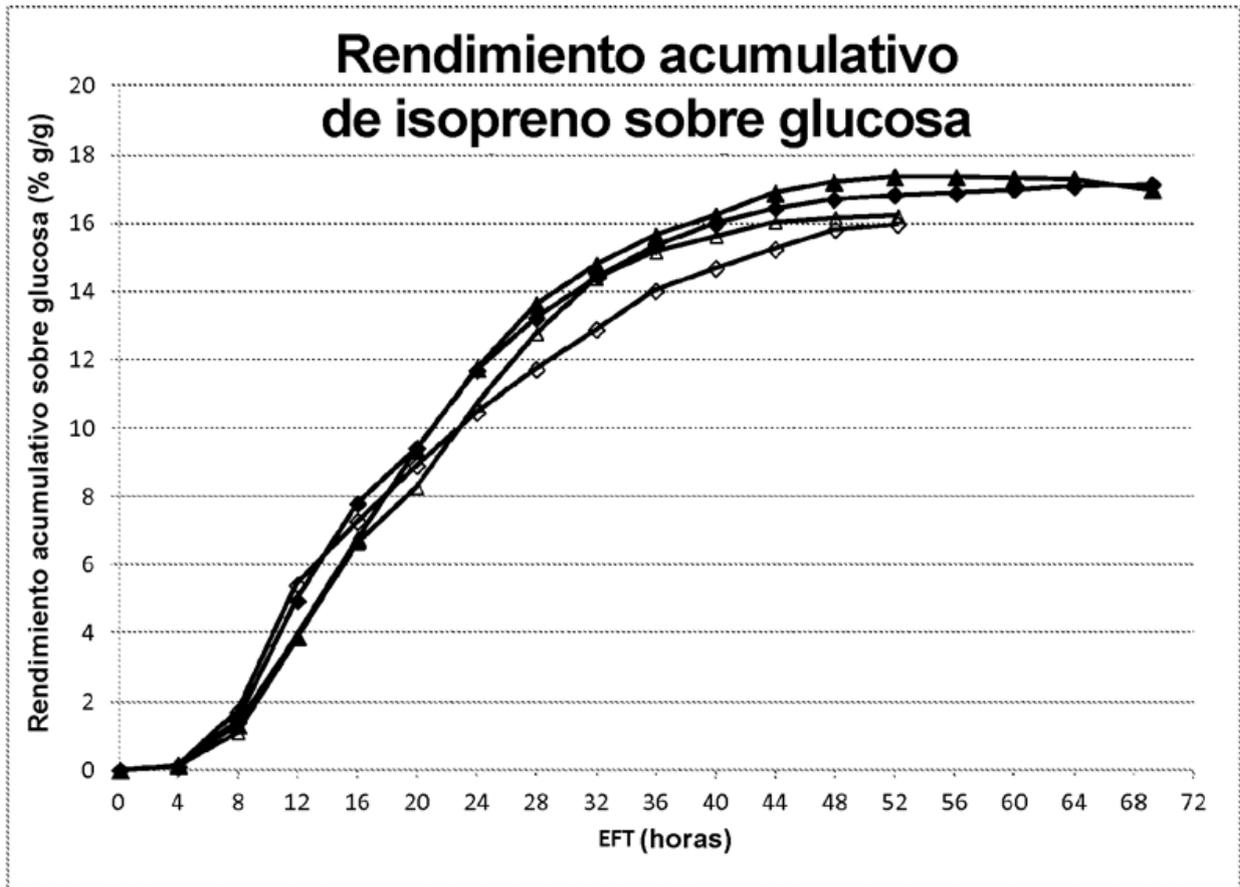


FIGURA 32:

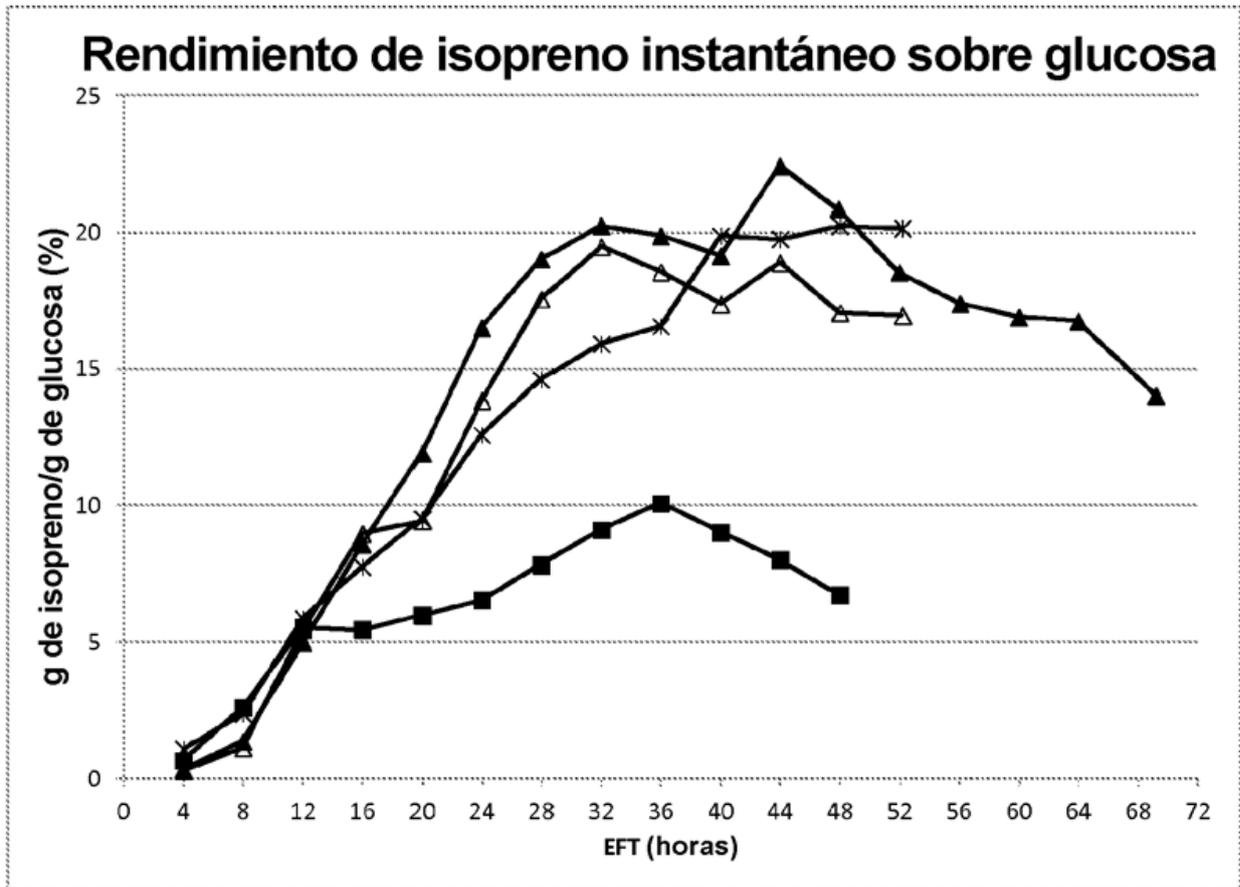


FIGURA 33:

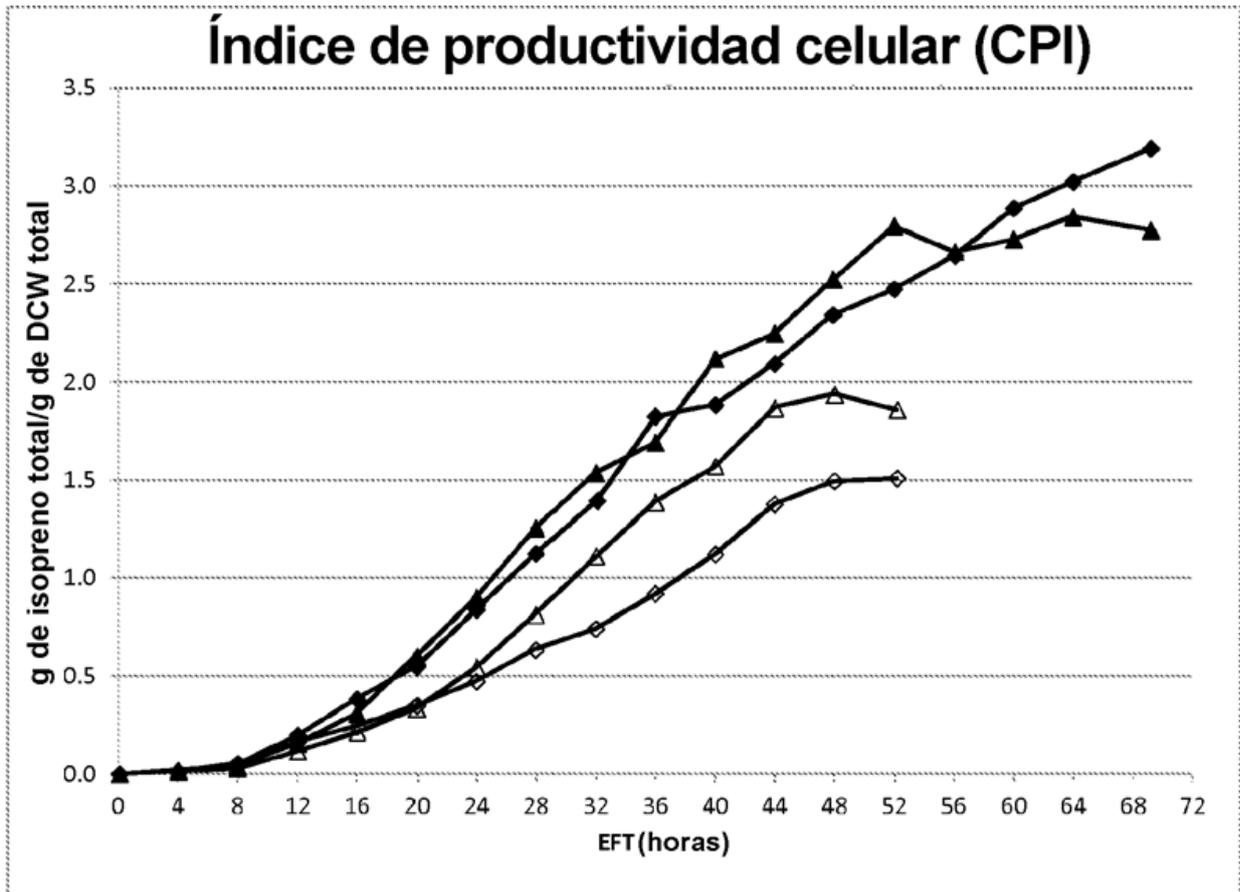


FIGURA 34:

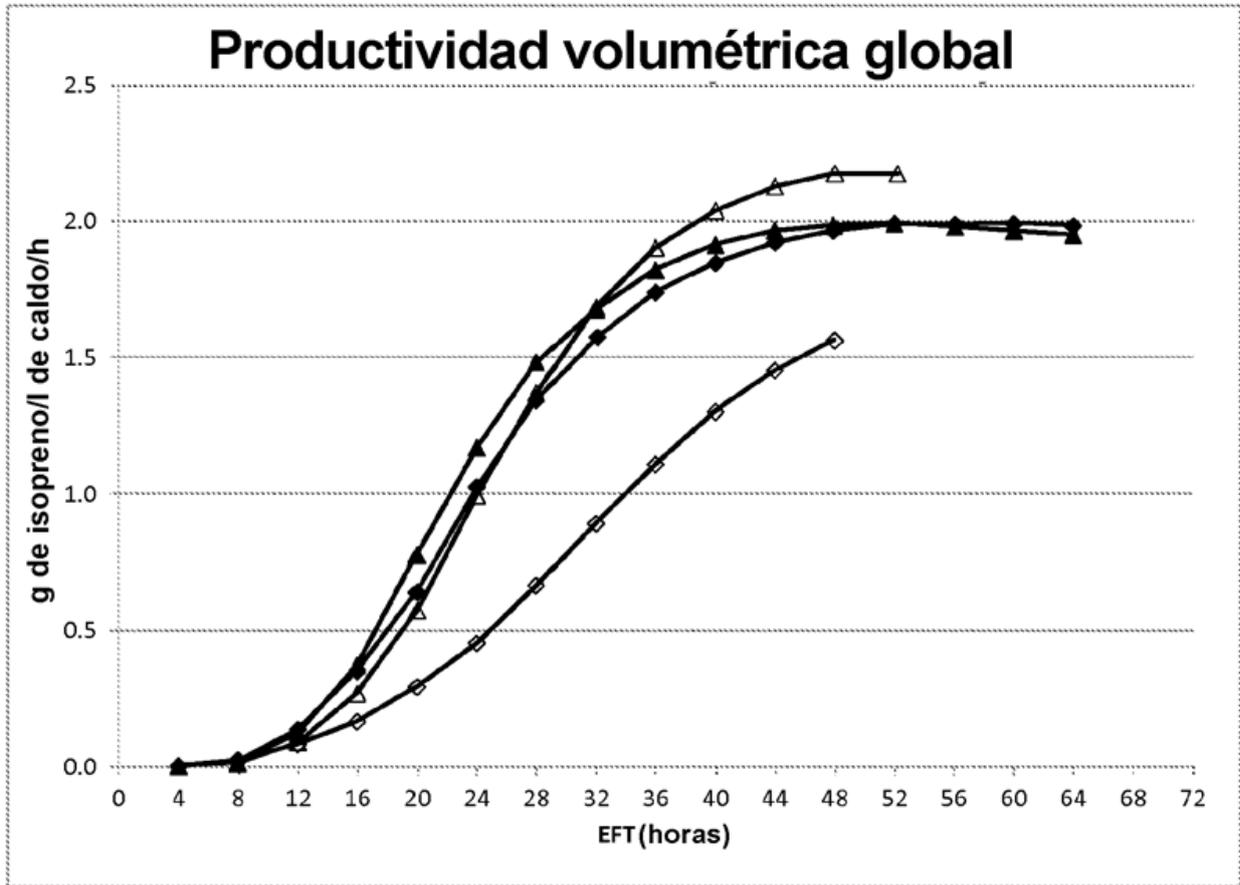


FIGURA 35:

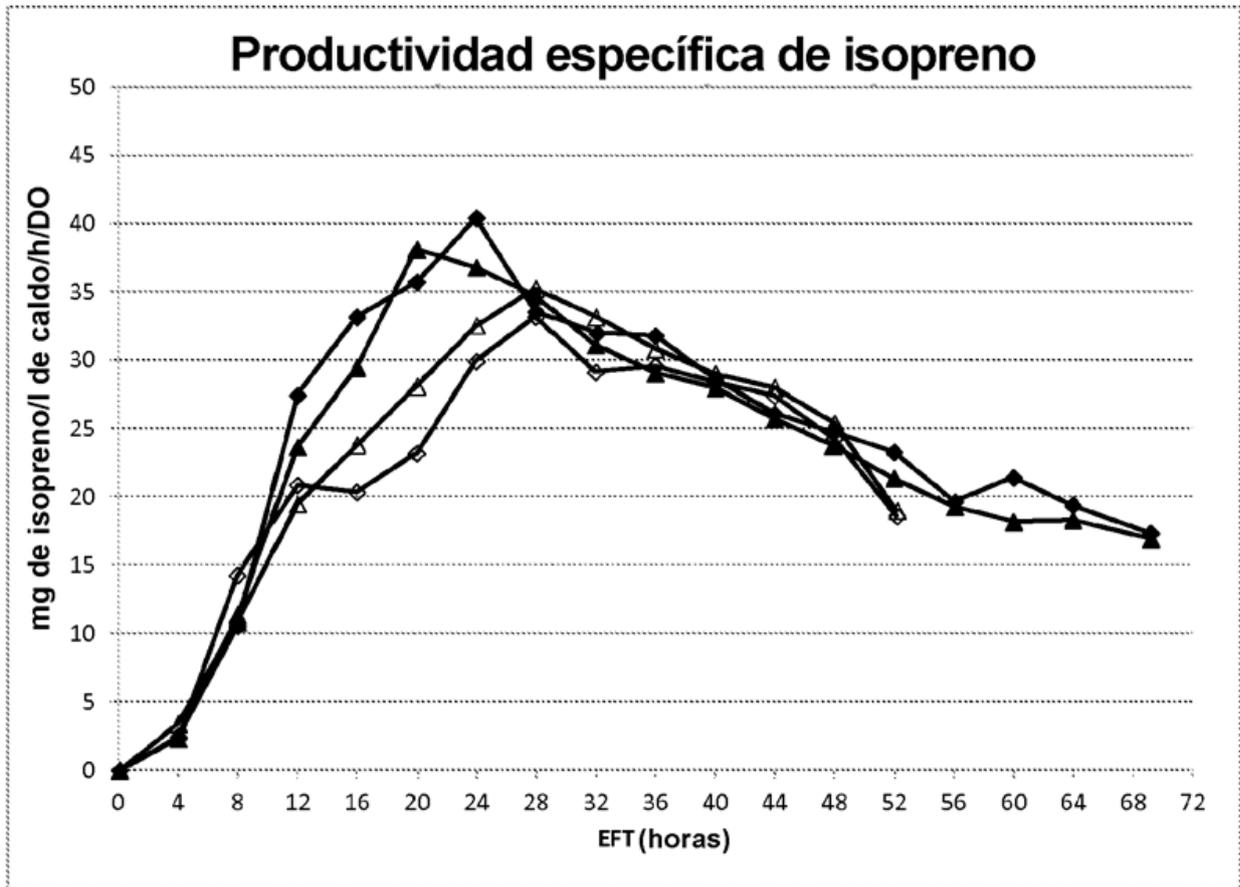


FIGURA 36:

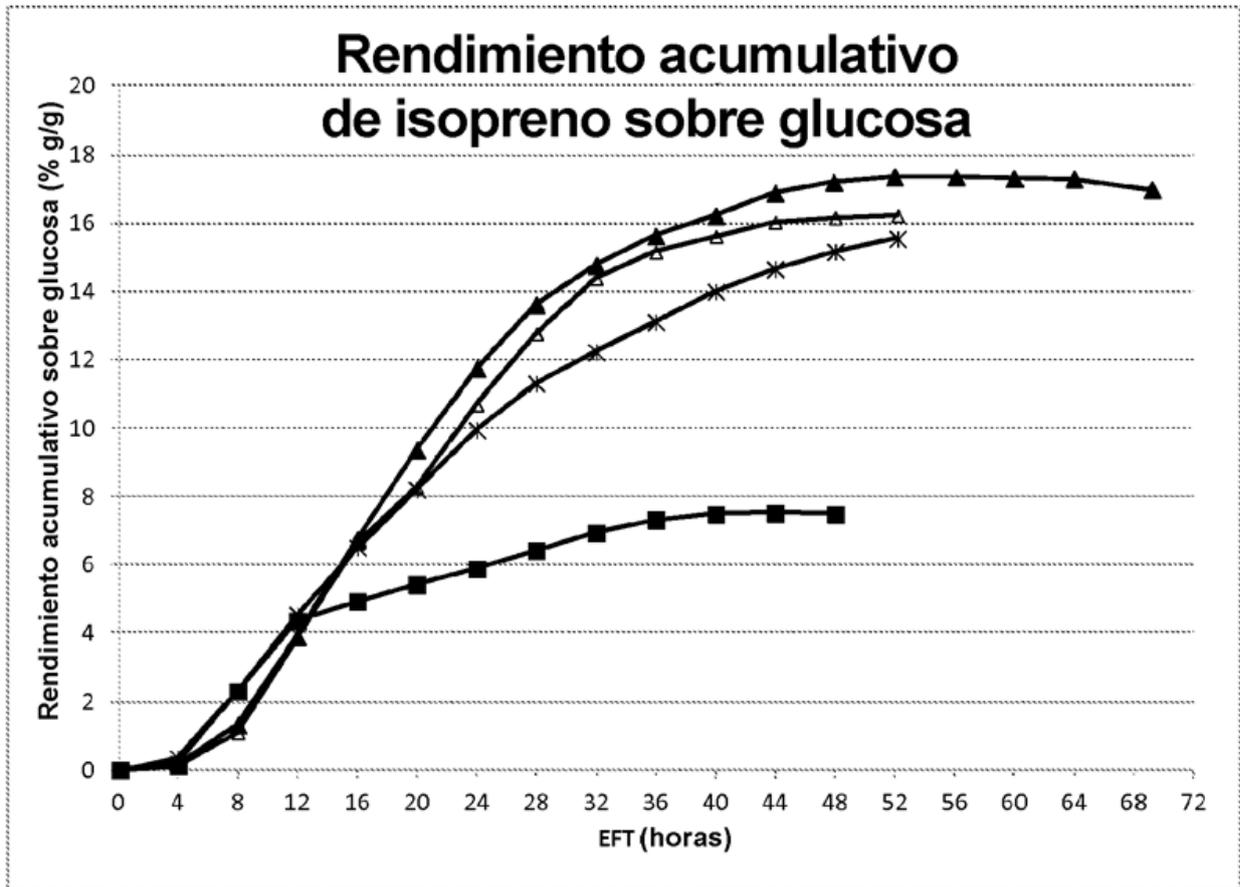


FIGURA 37:

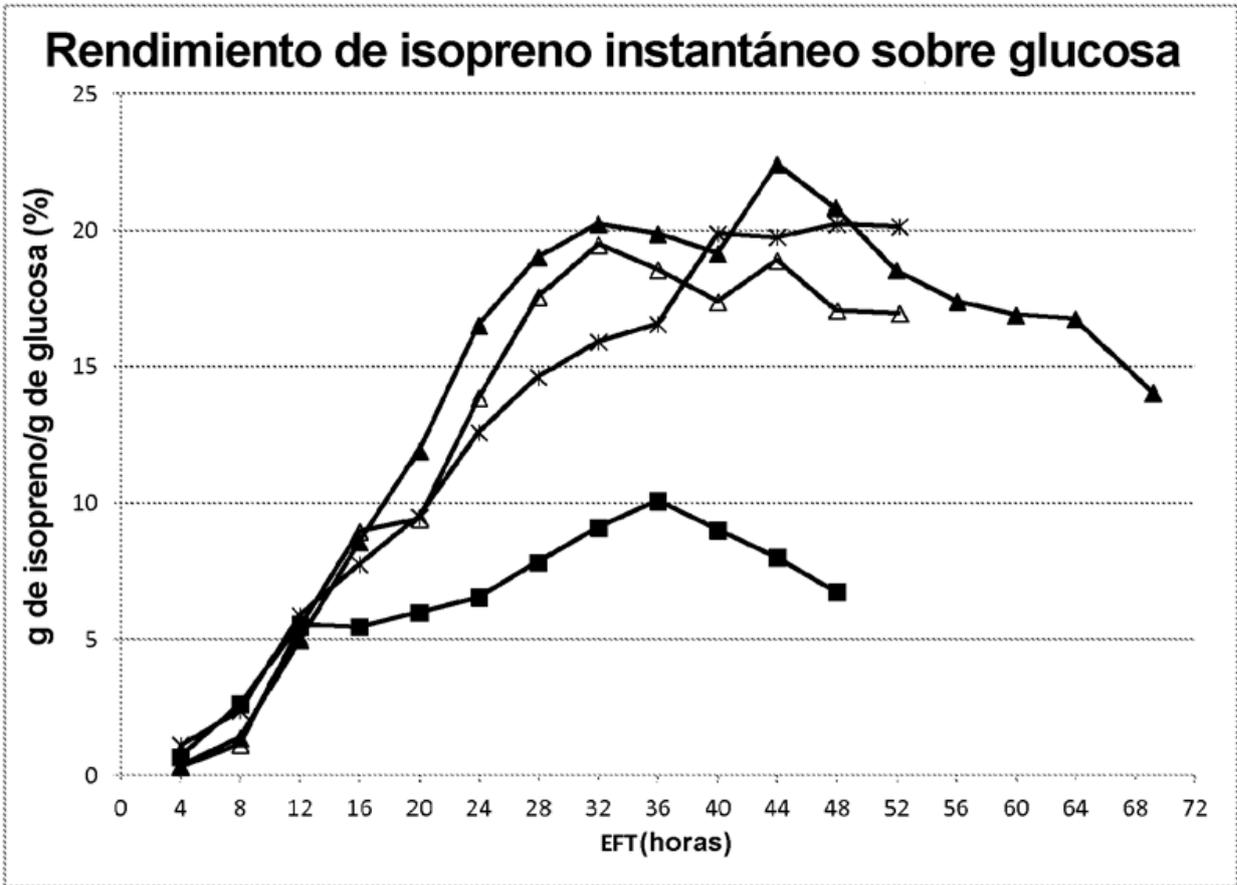


FIGURA 38:

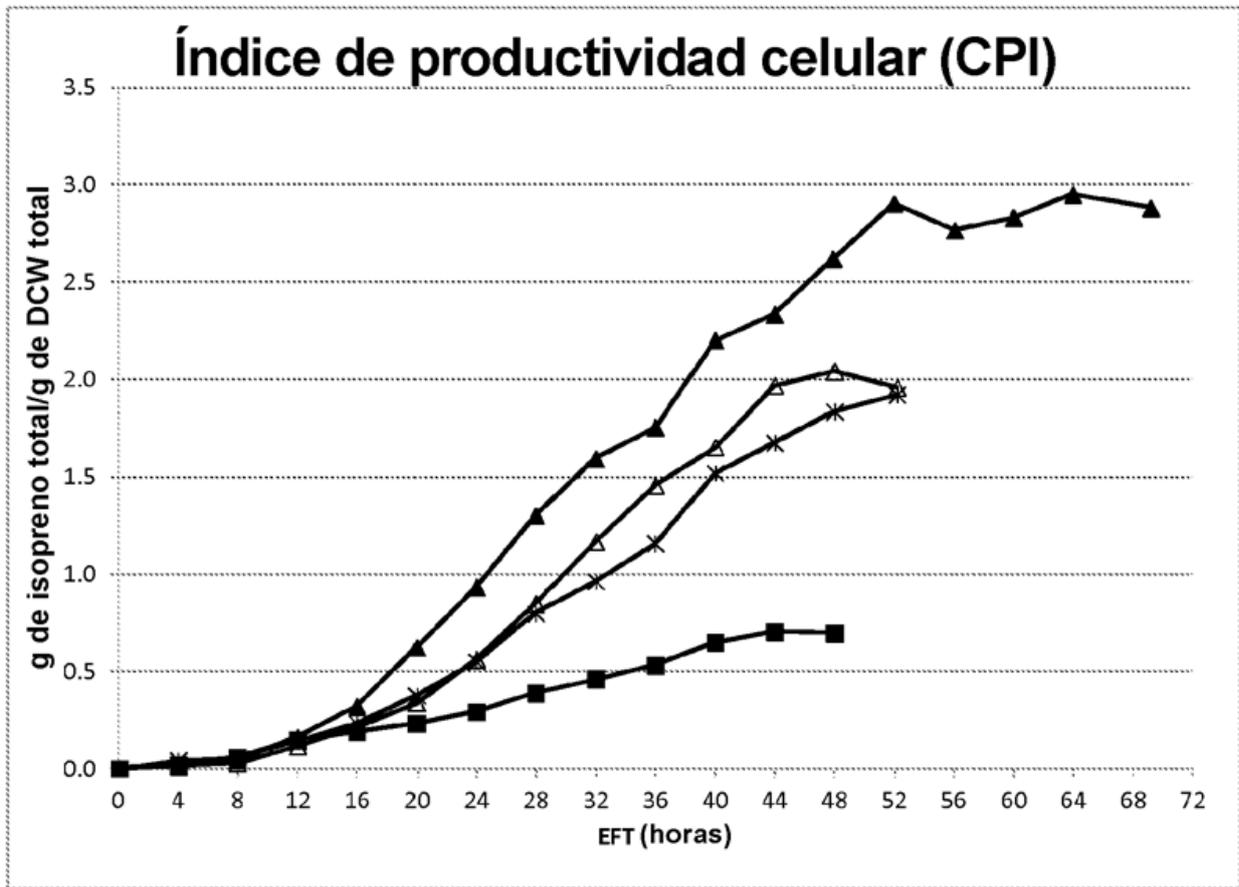


FIGURA 39:

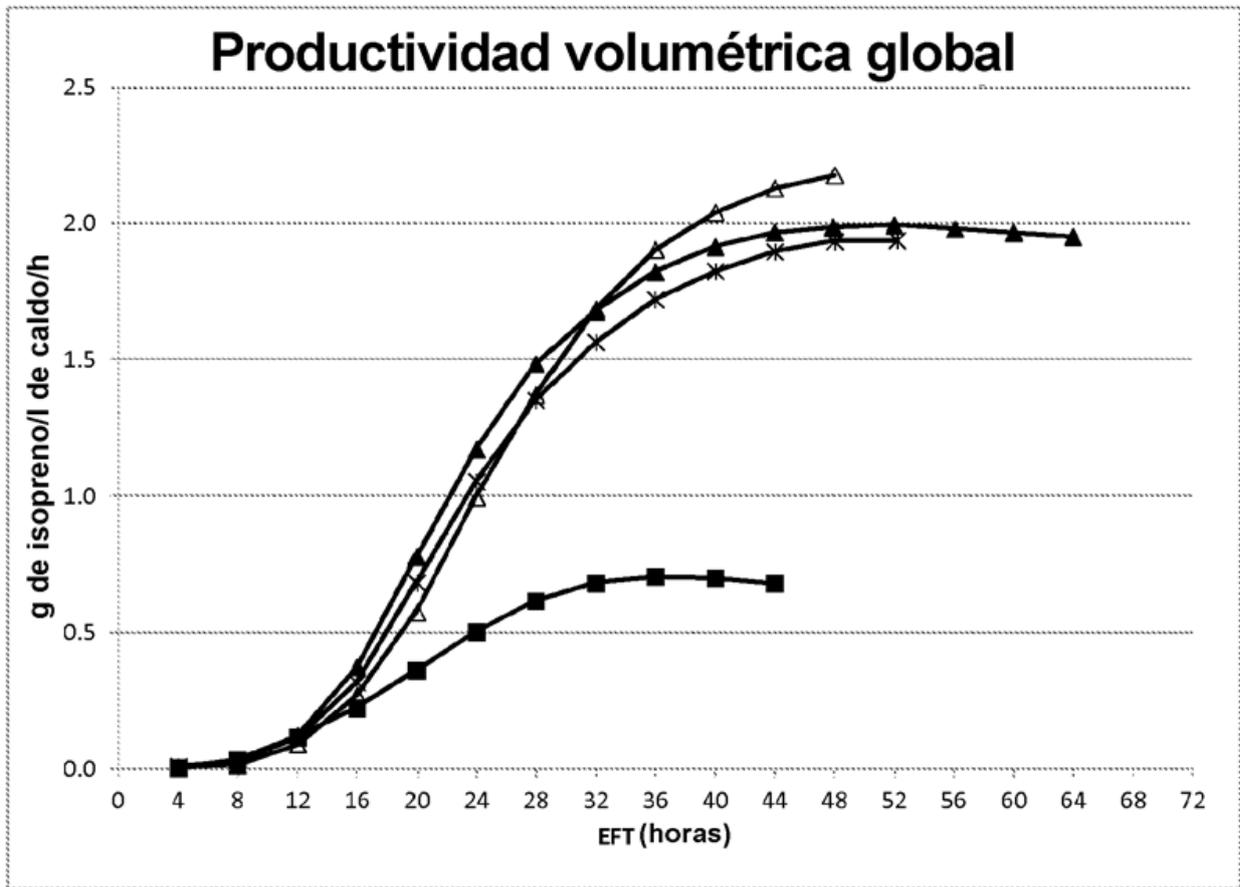


FIGURA 40:

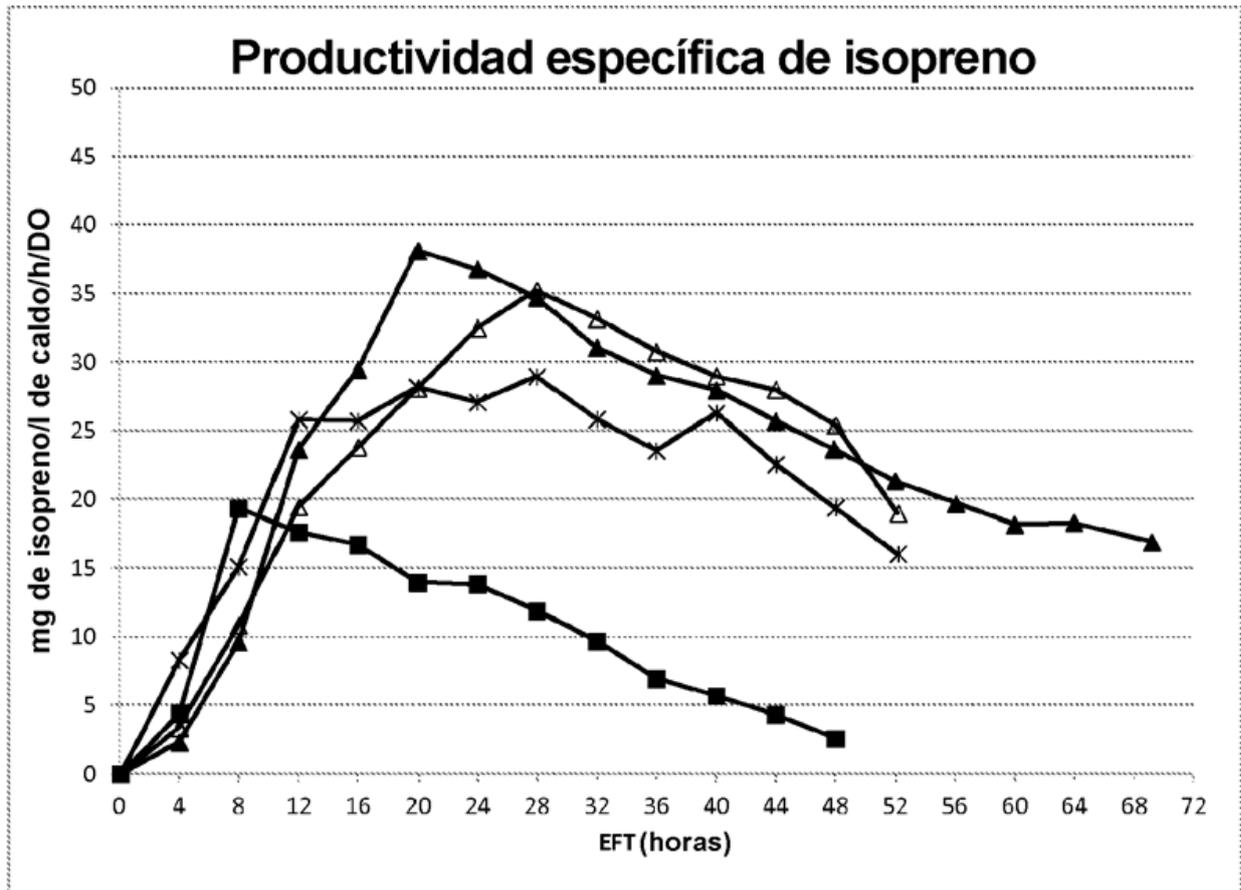


FIGURA 41:

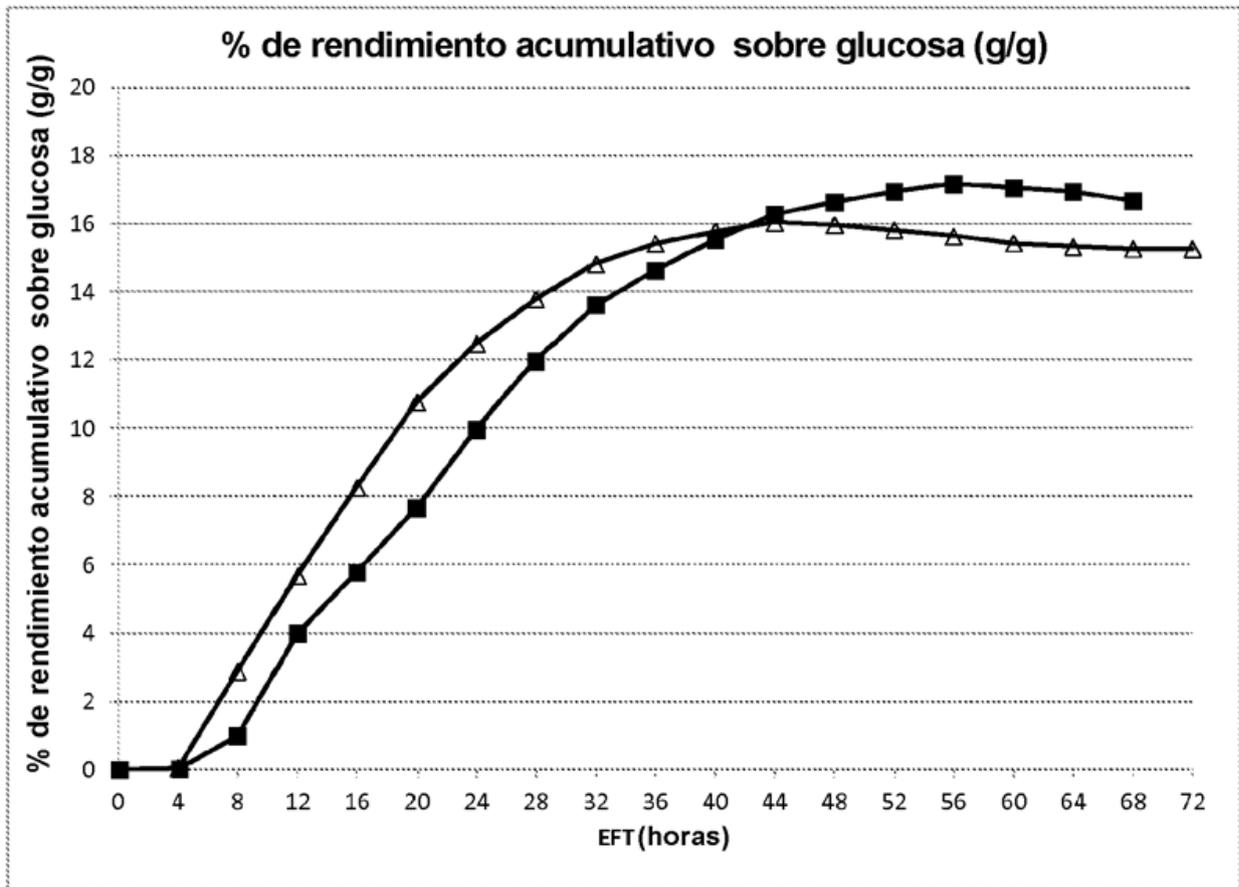


FIGURA 42:

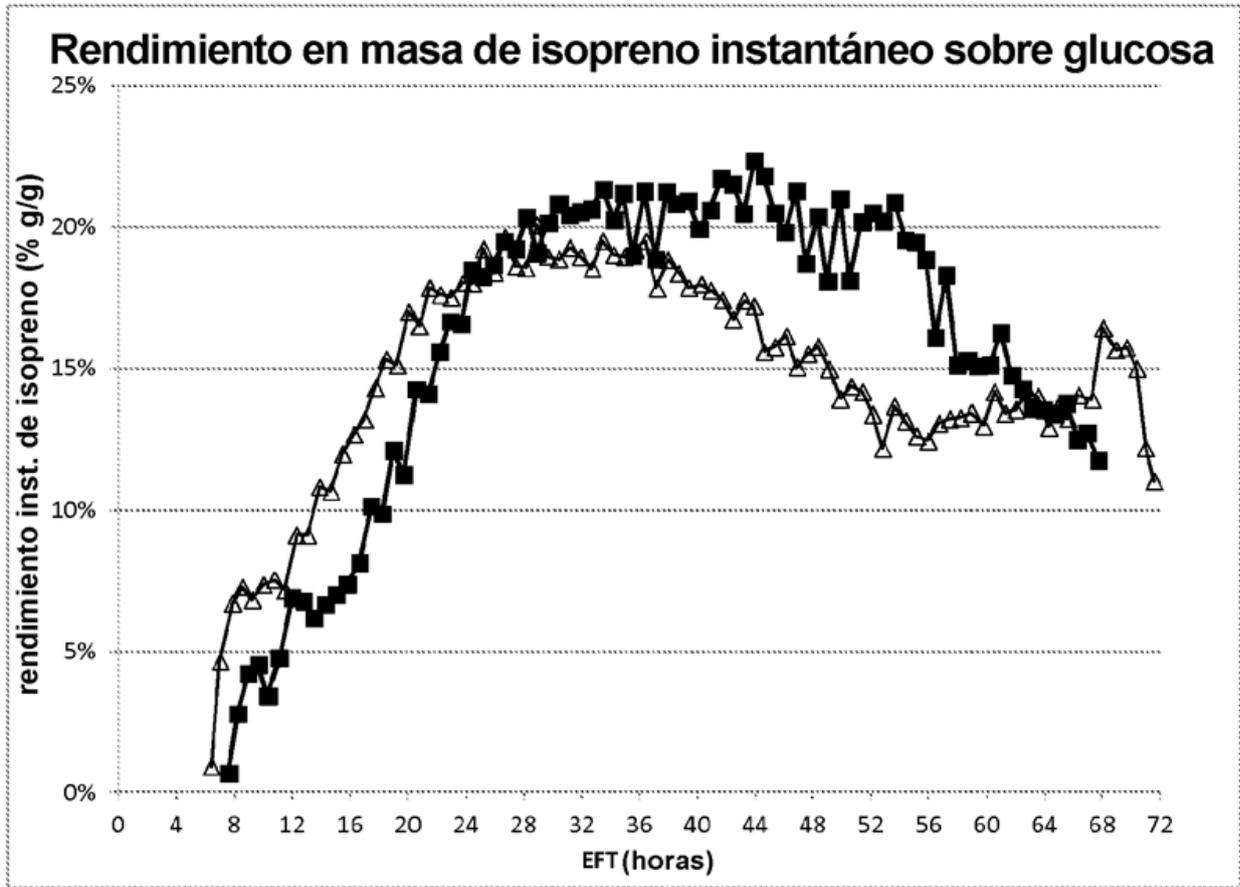


FIGURA 43:

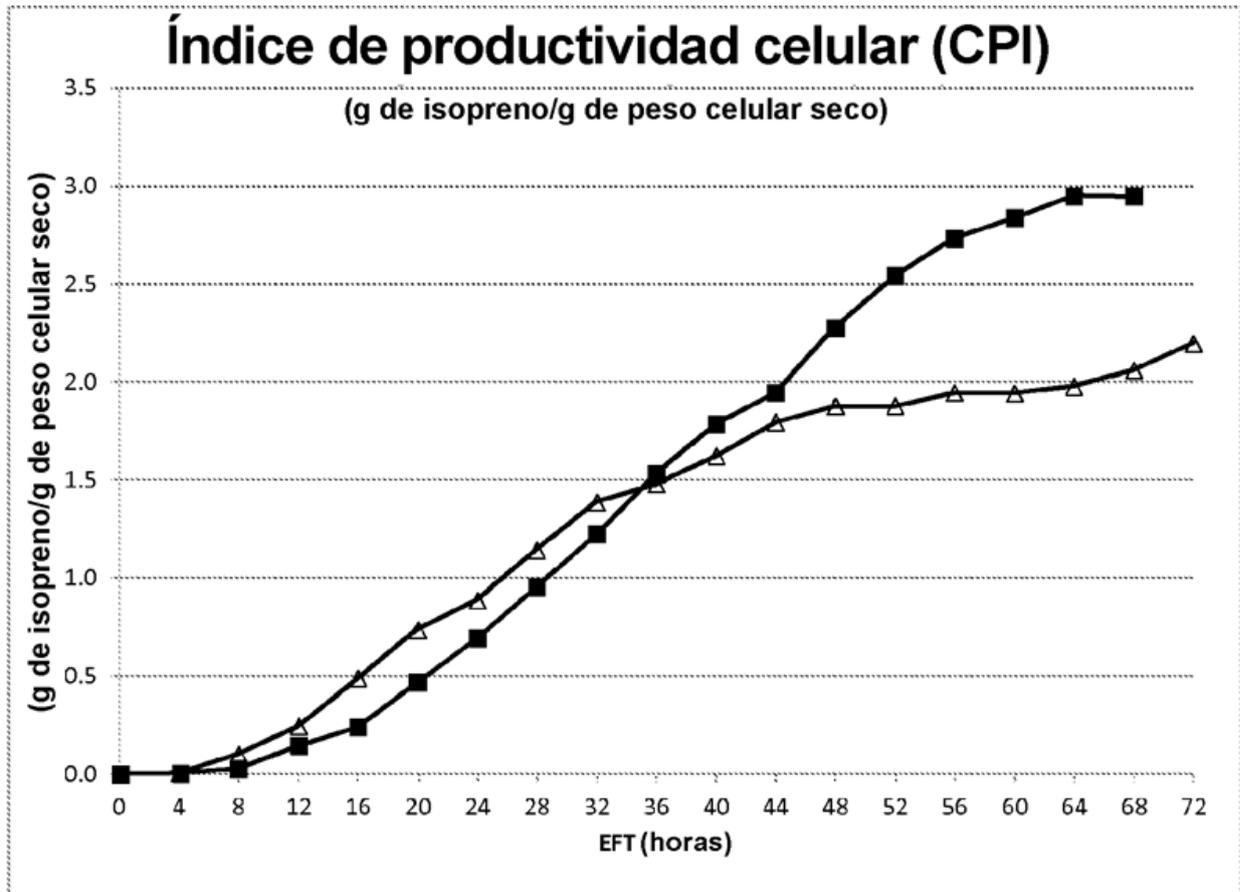


FIGURA 44

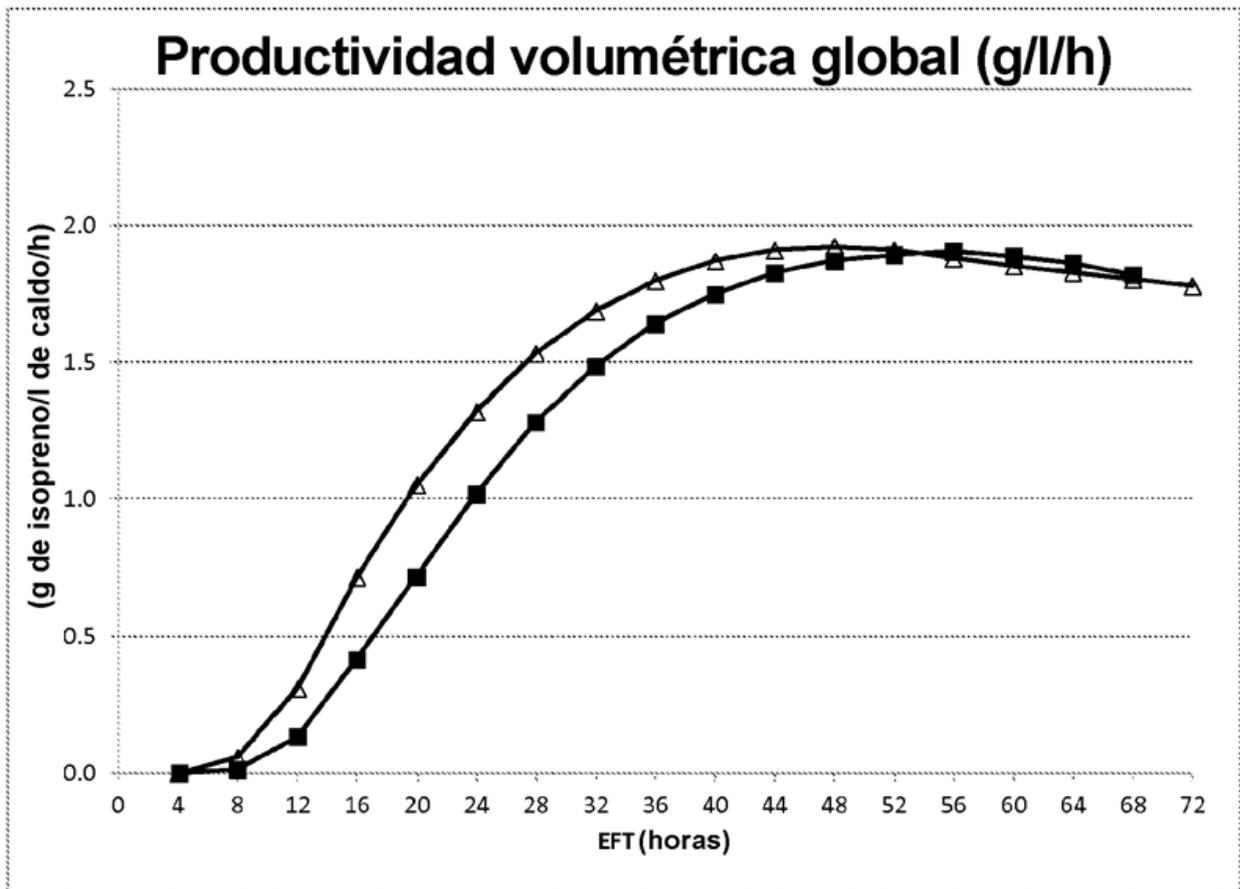


FIGURA 45

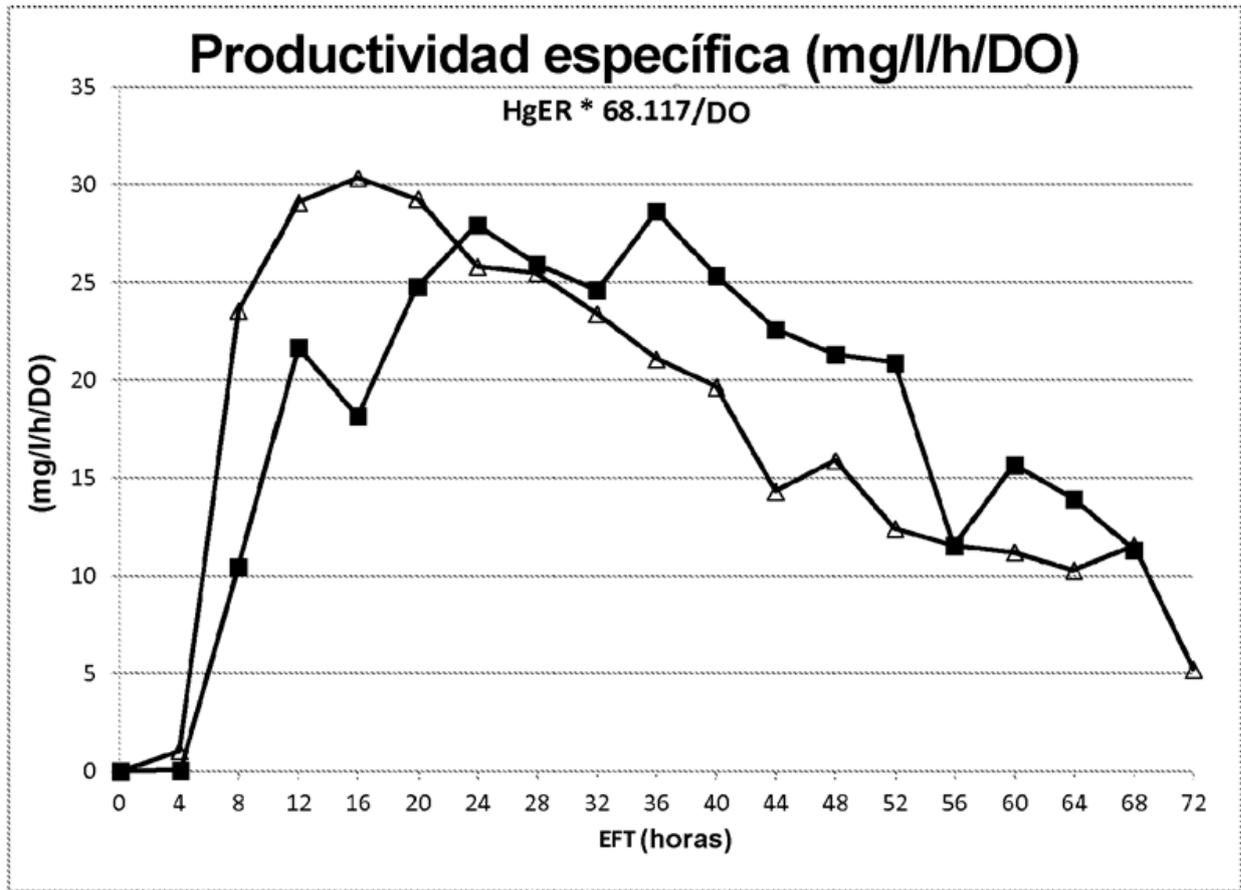


FIGURA 46:

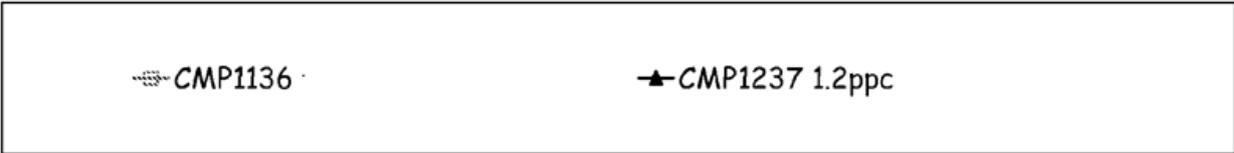
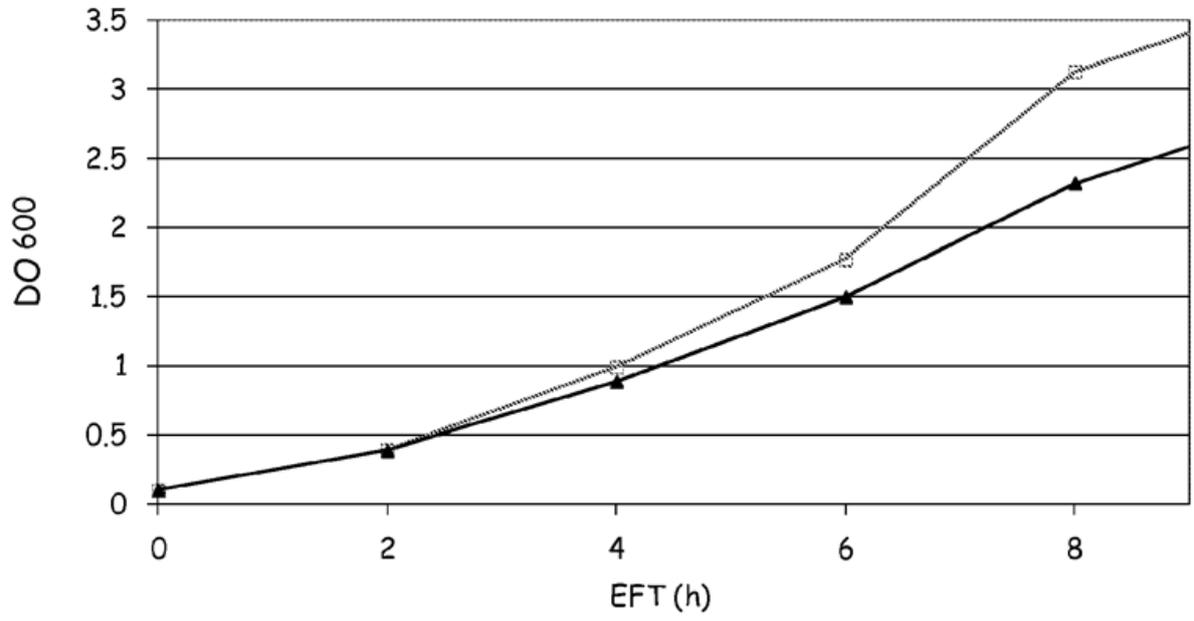


FIGURA 47:

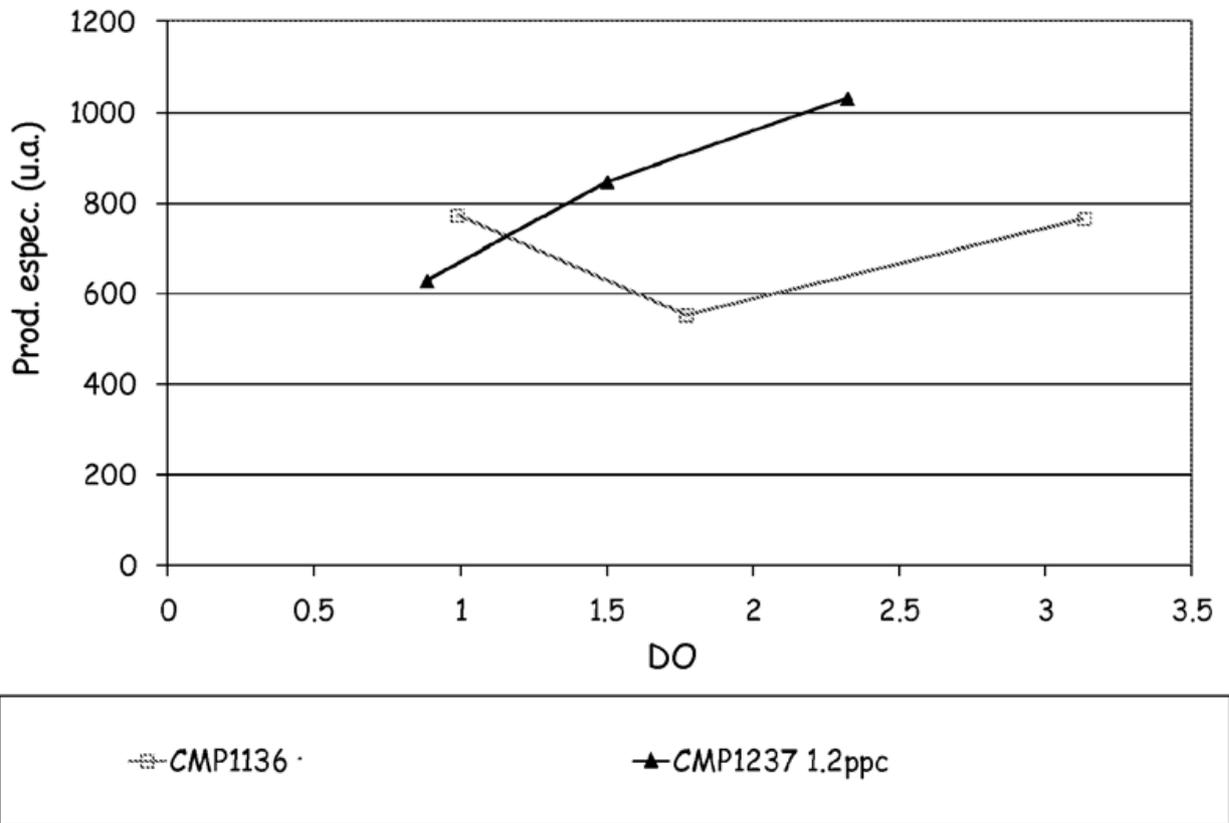


FIGURA 48:

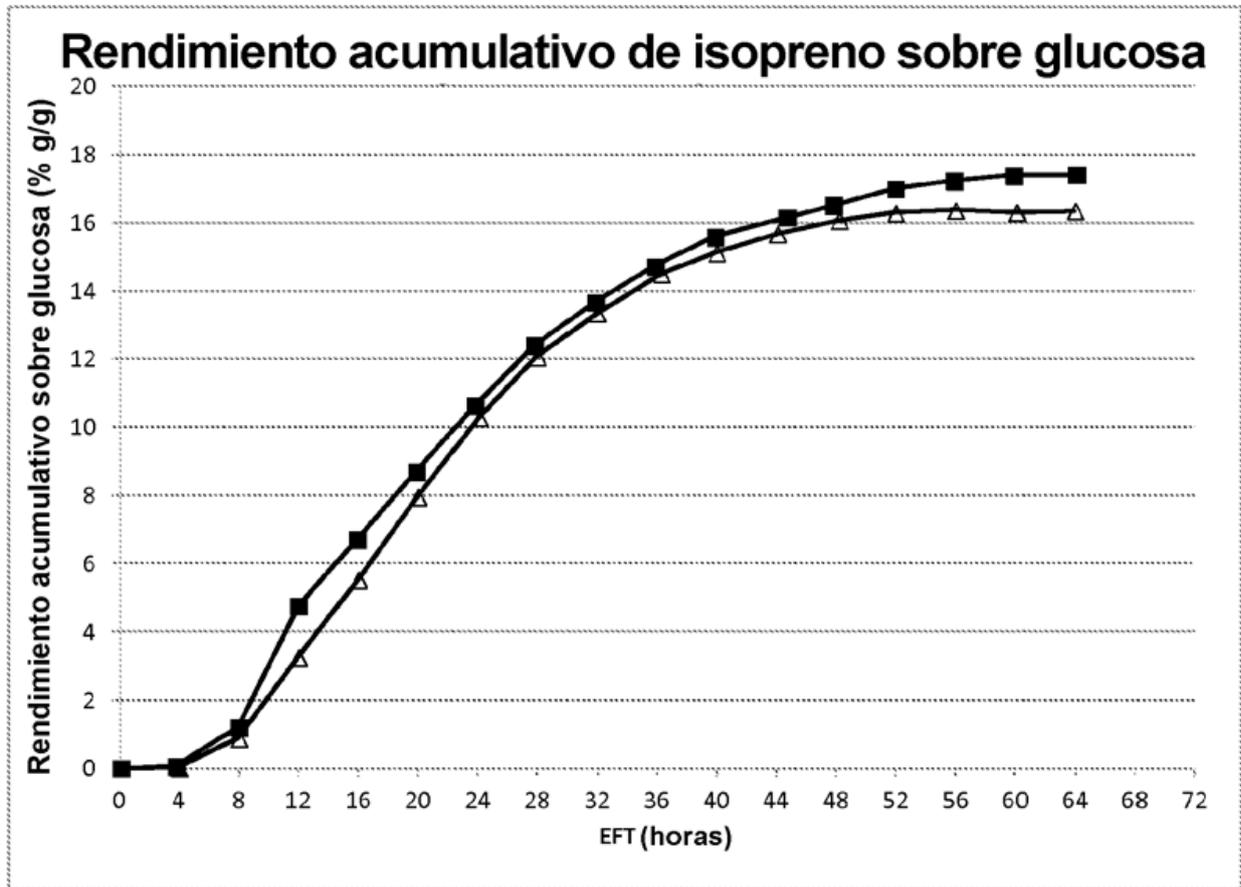


FIGURA 49:

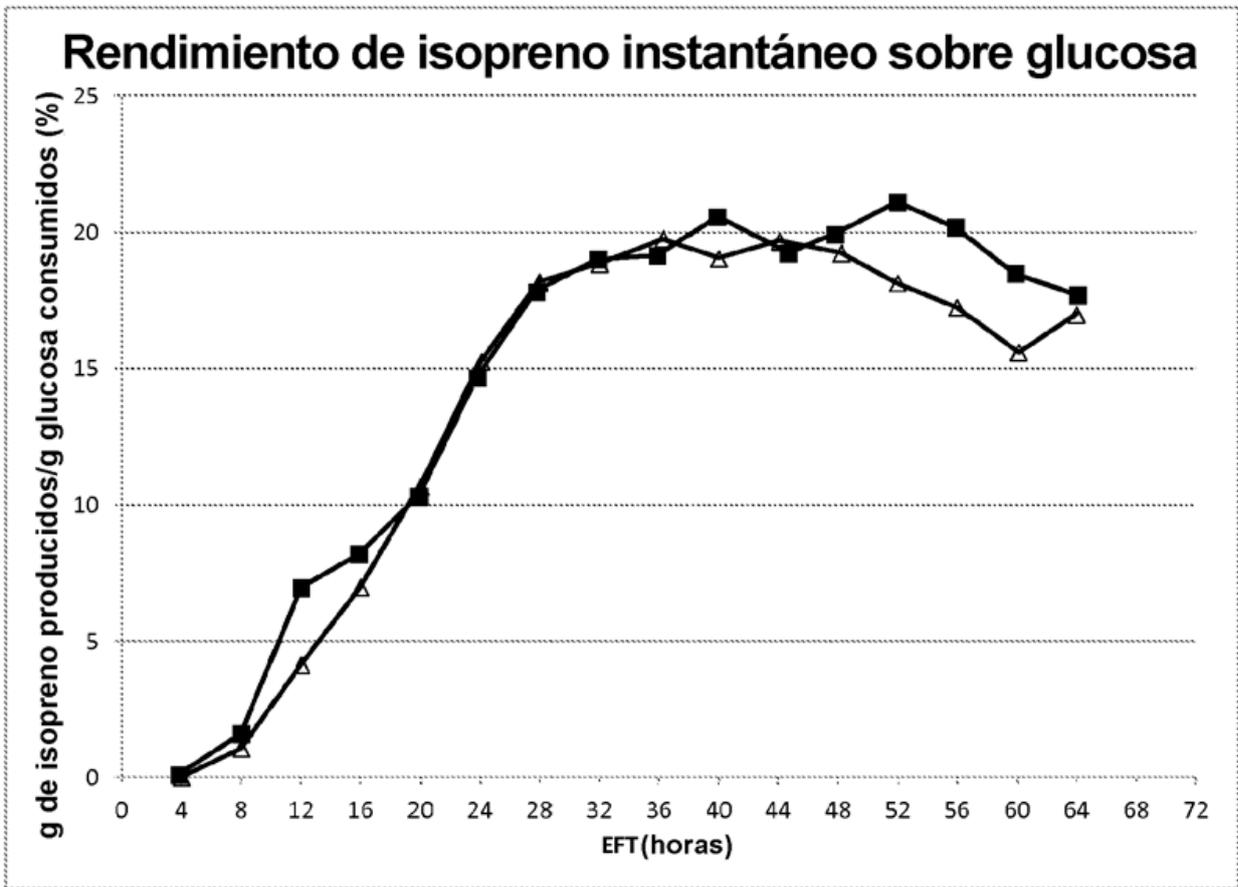


FIGURA 50:

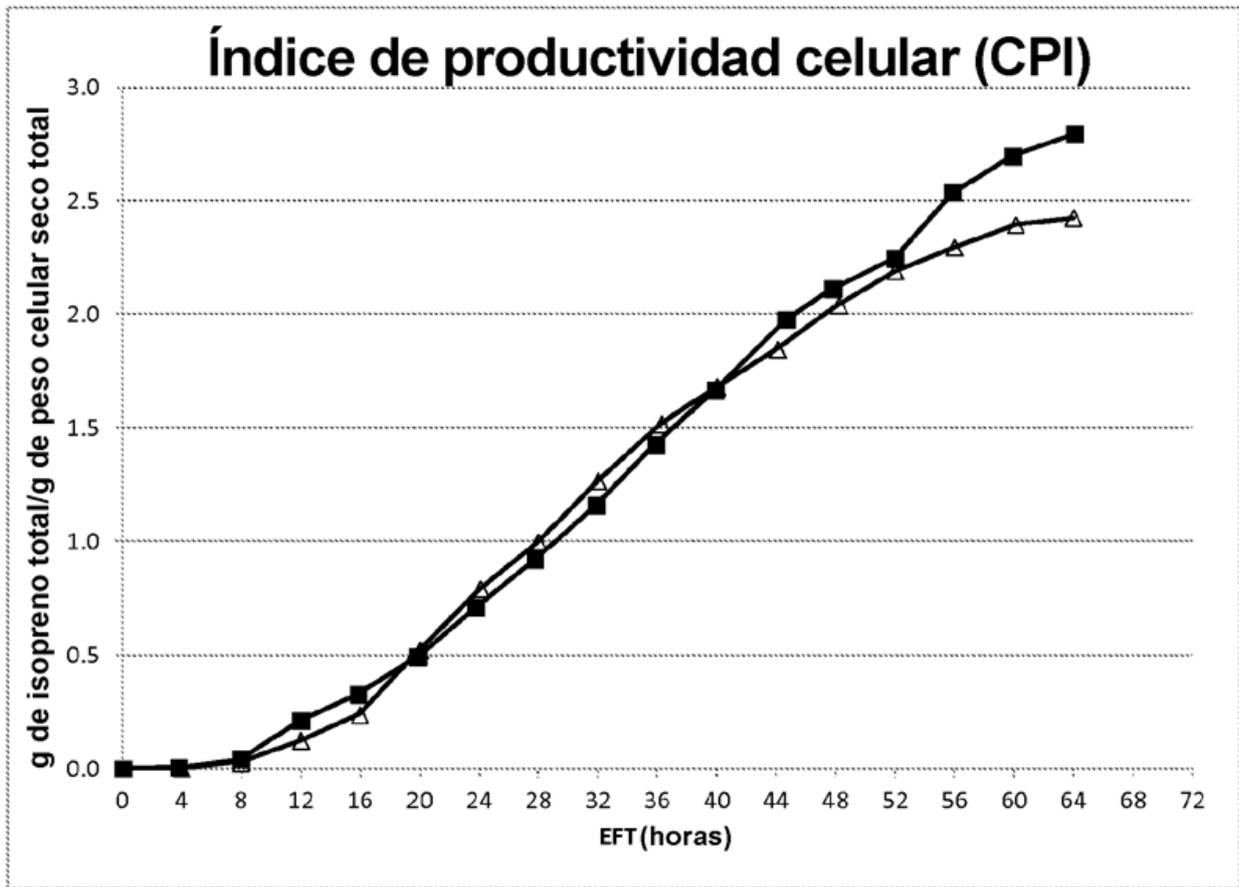


FIGURA 51:

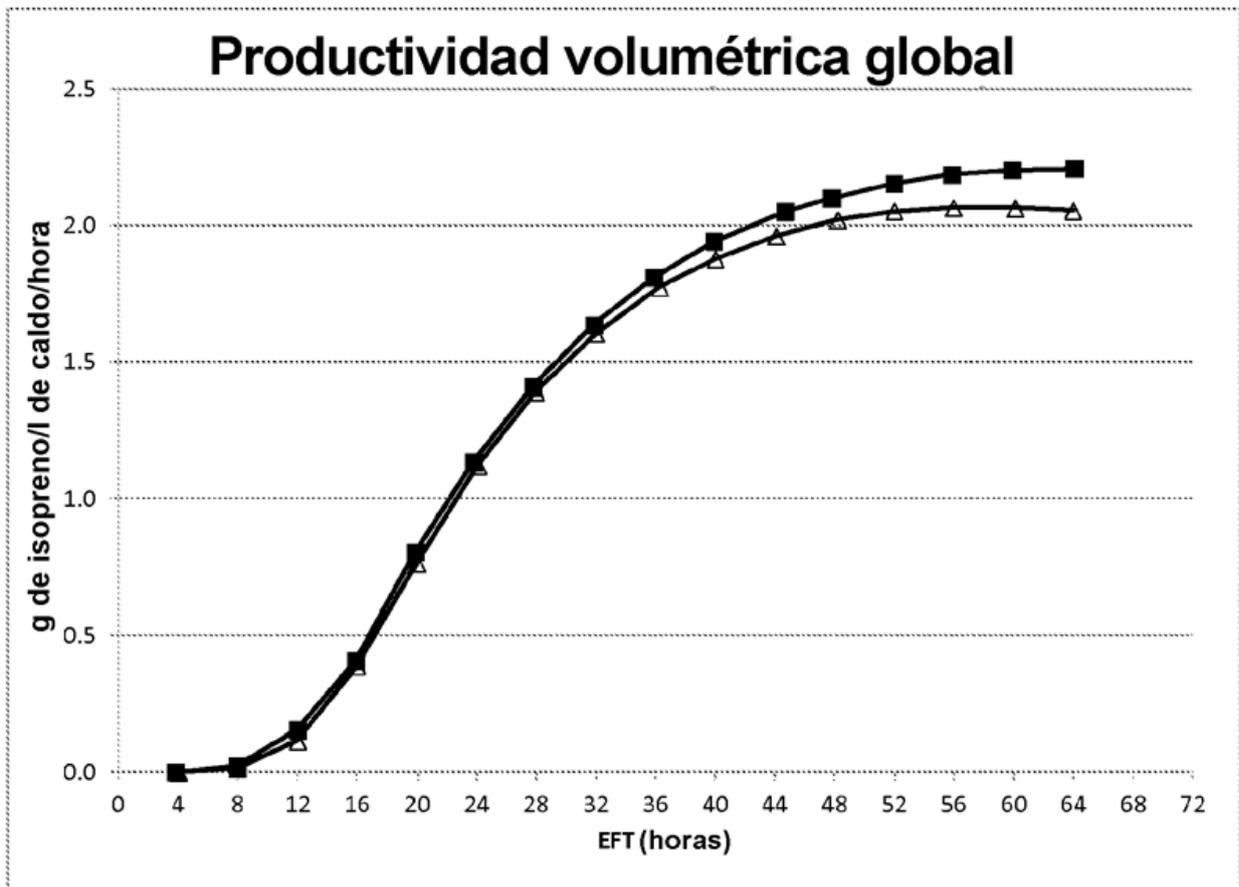


FIGURA 52:

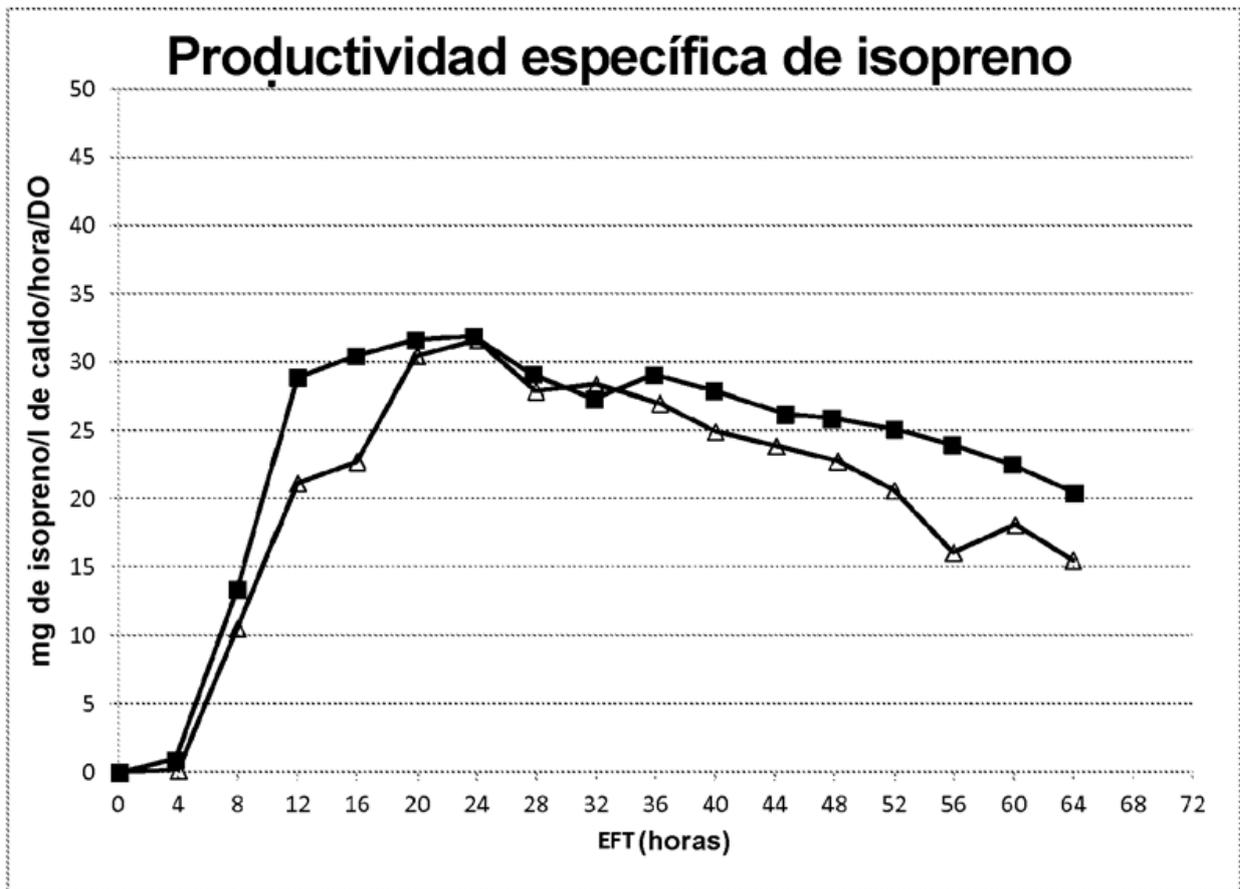


FIGURA 53:

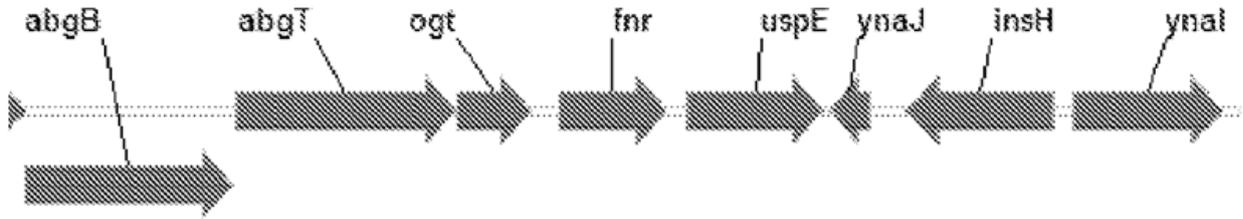


FIGURA 54:

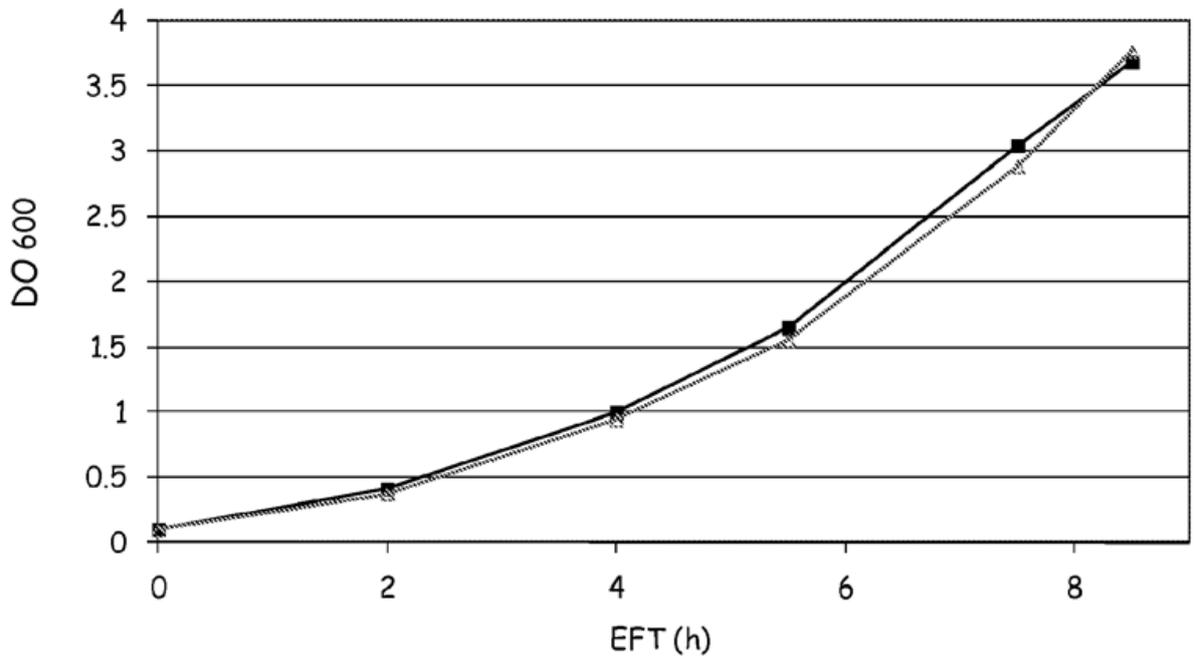


FIGURA 55:

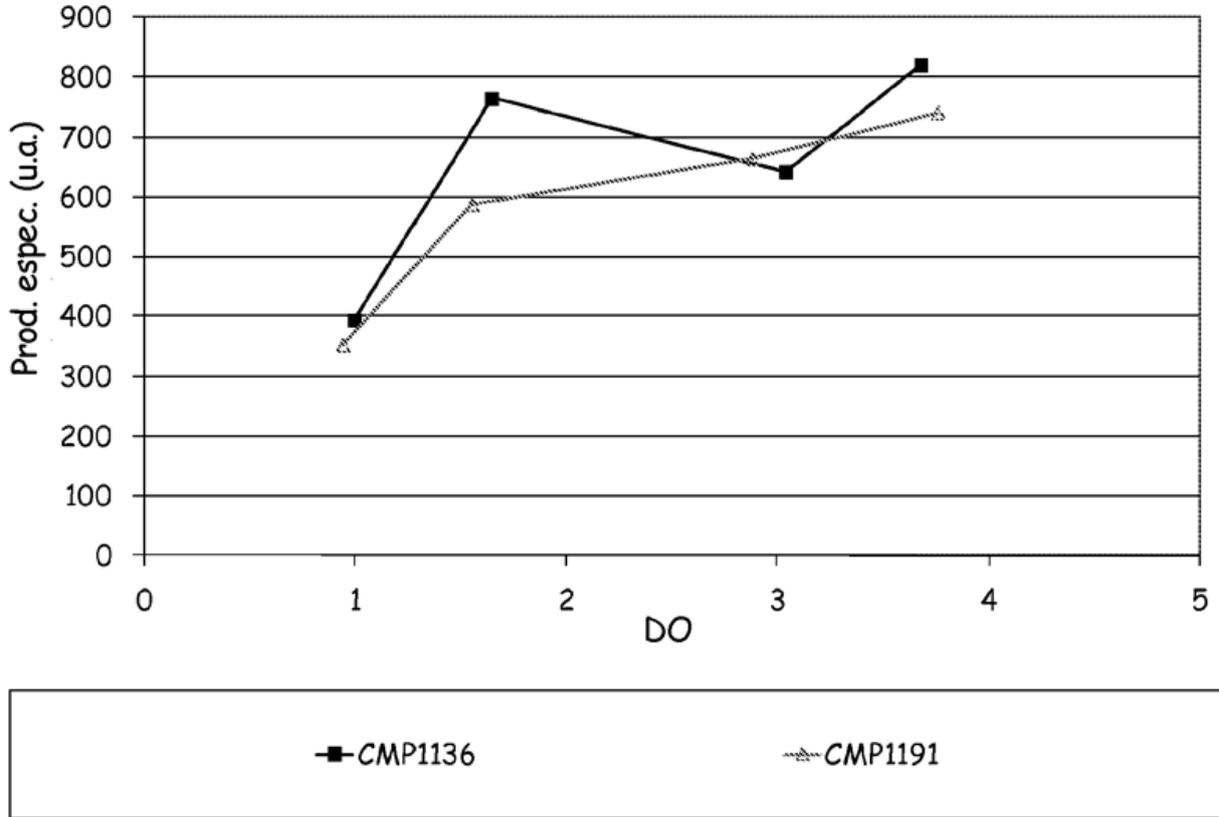


FIGURA 56:

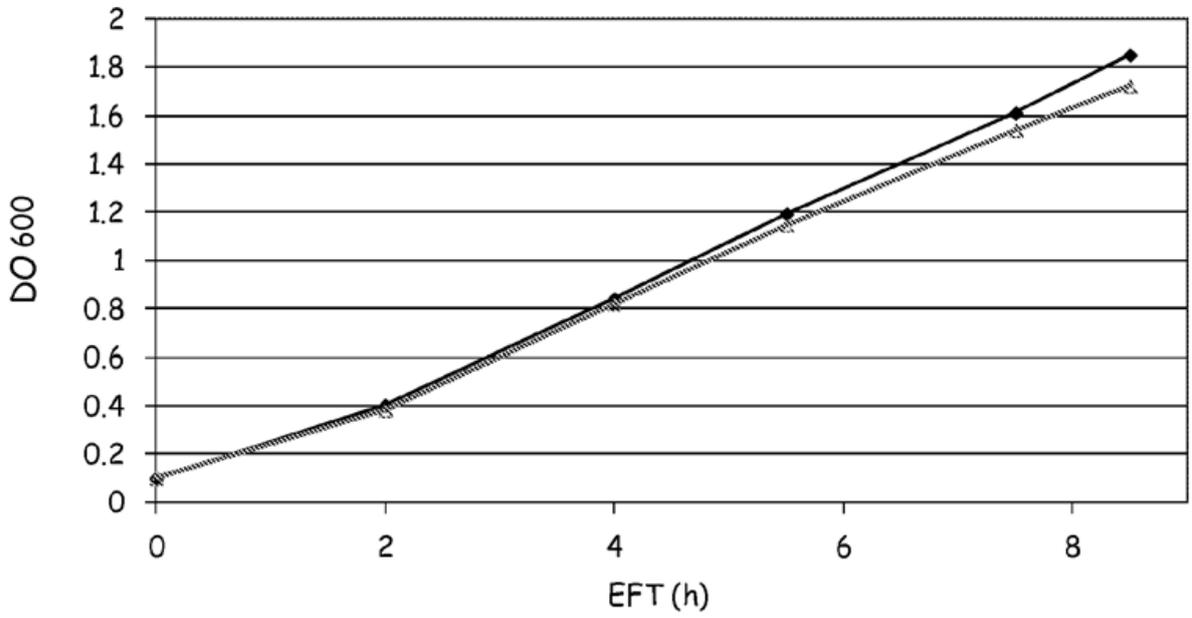


FIGURA 57:

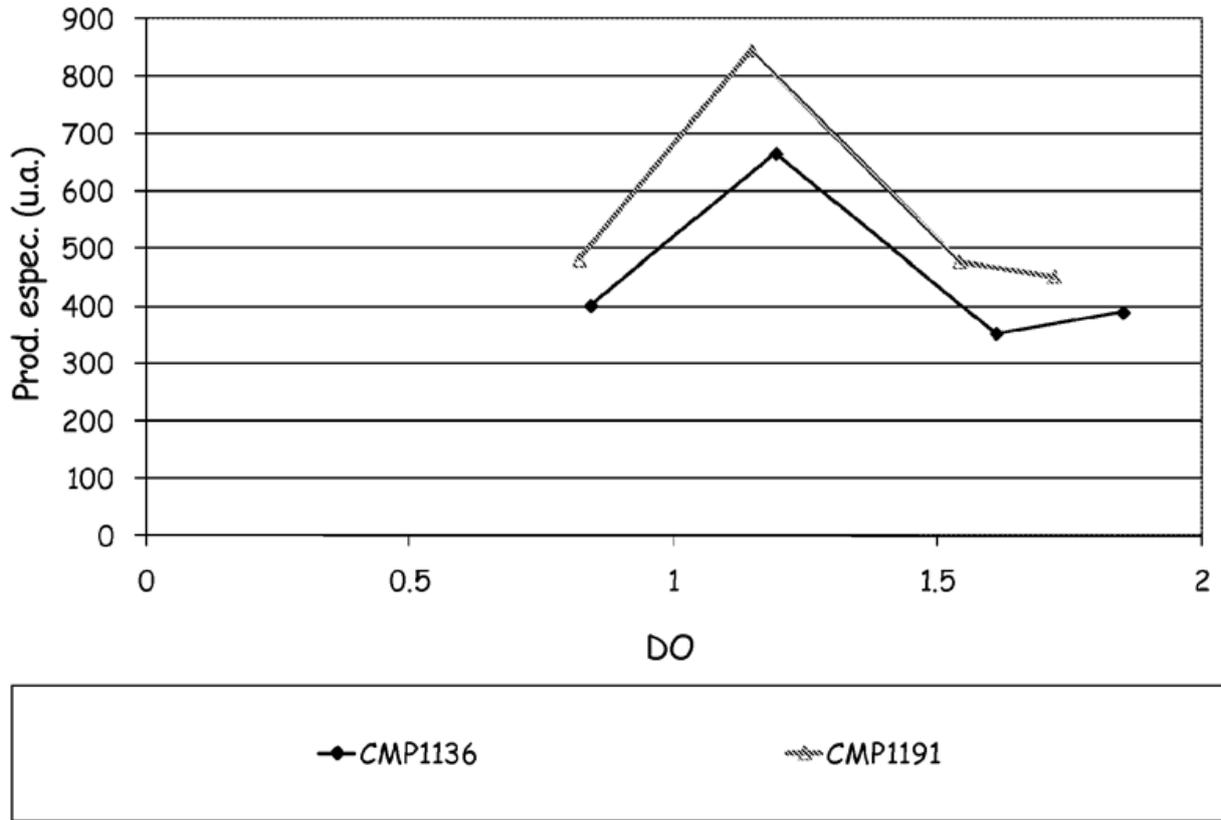


FIGURA 58:

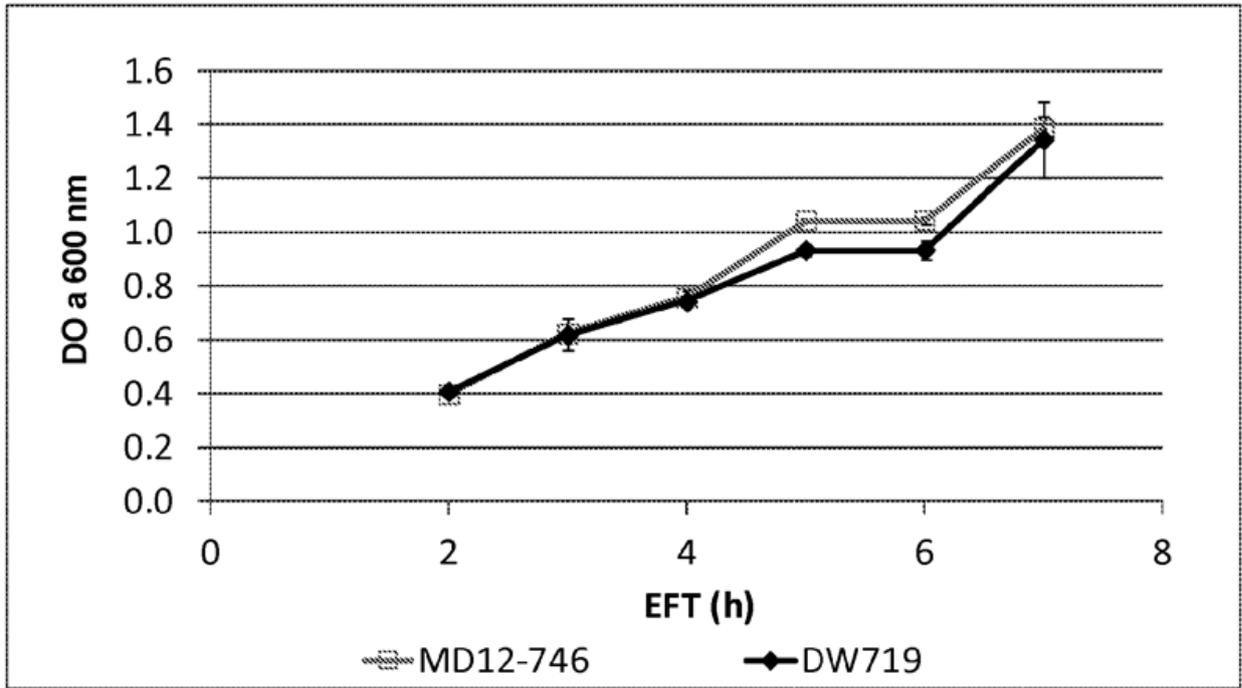


FIGURA 59:

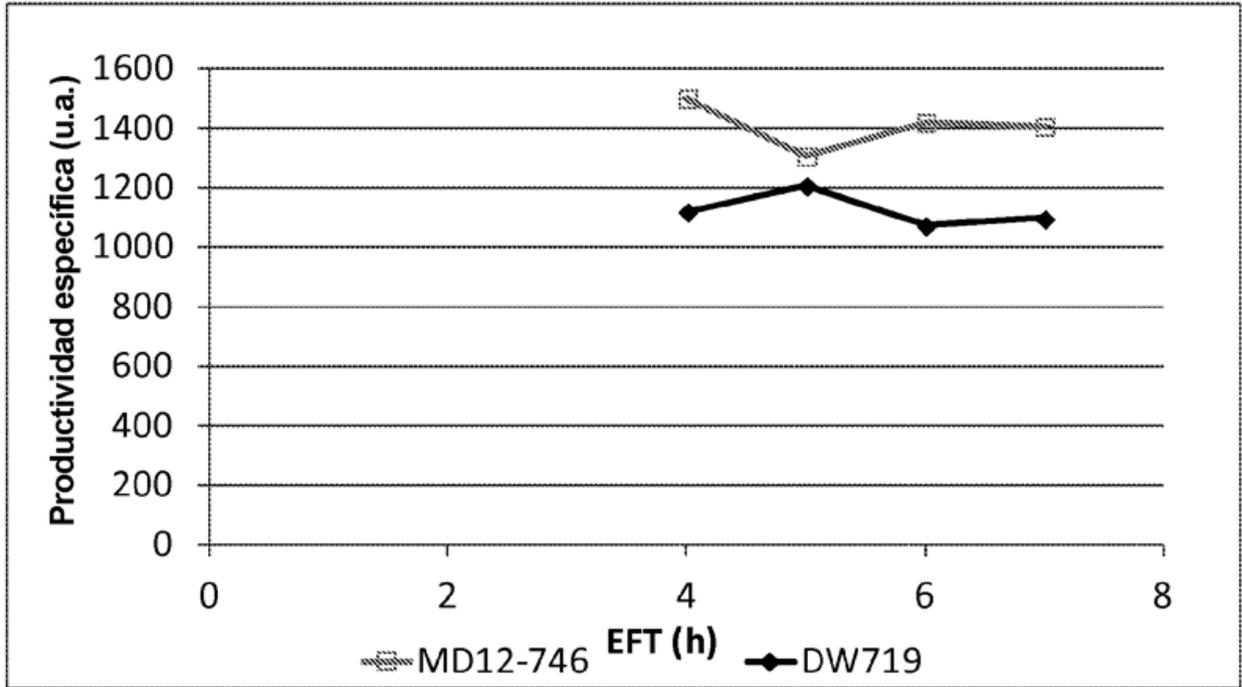


FIGURA 60:

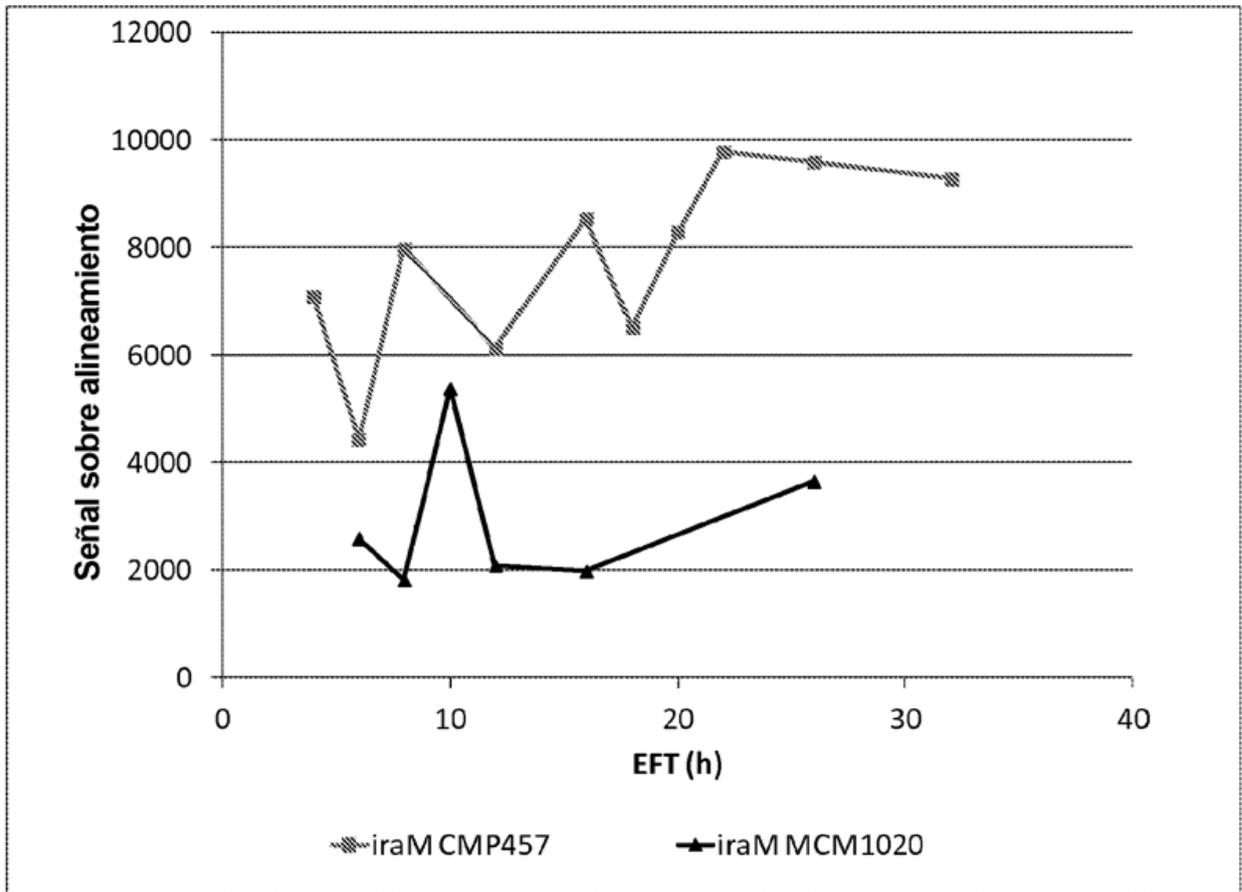


FIGURA 61:

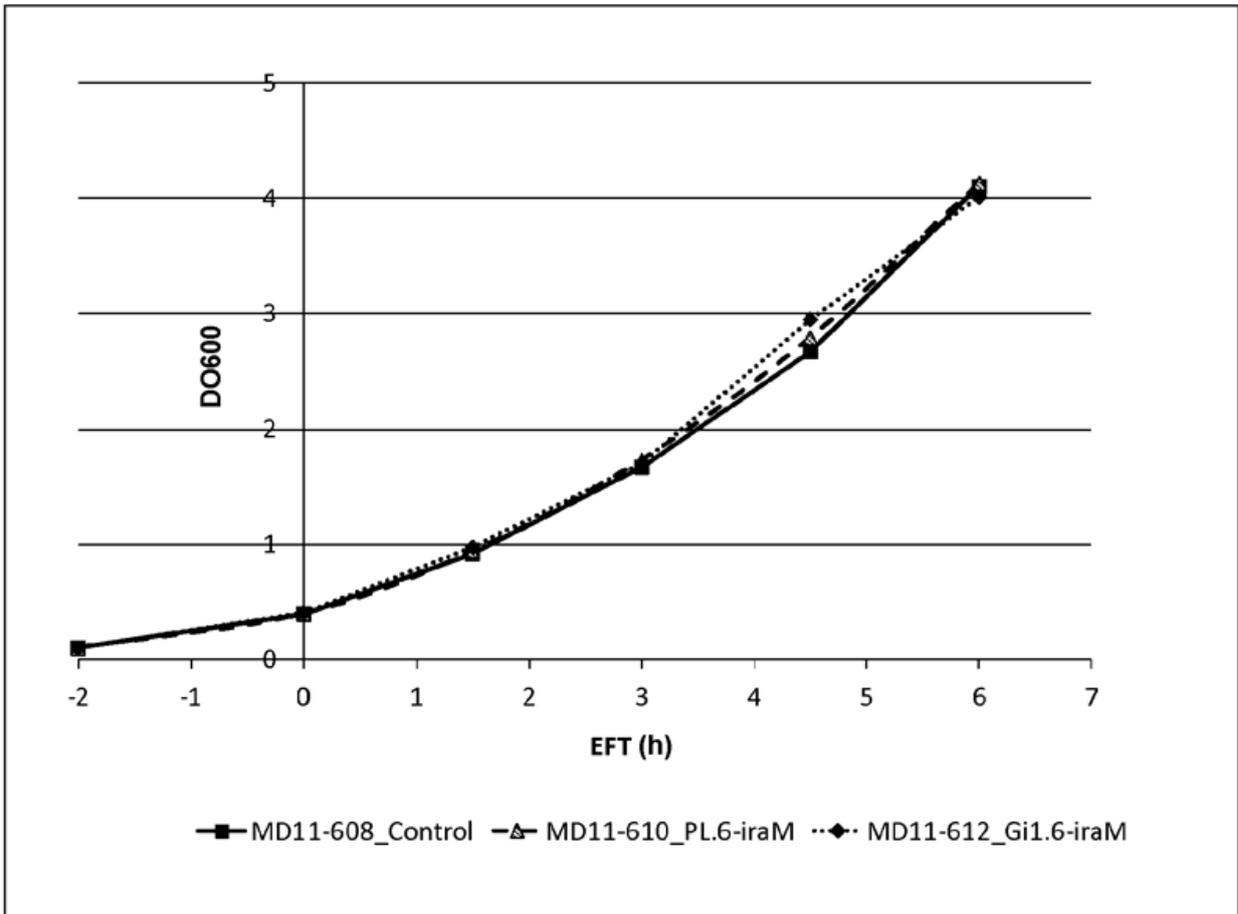


FIGURA 62:

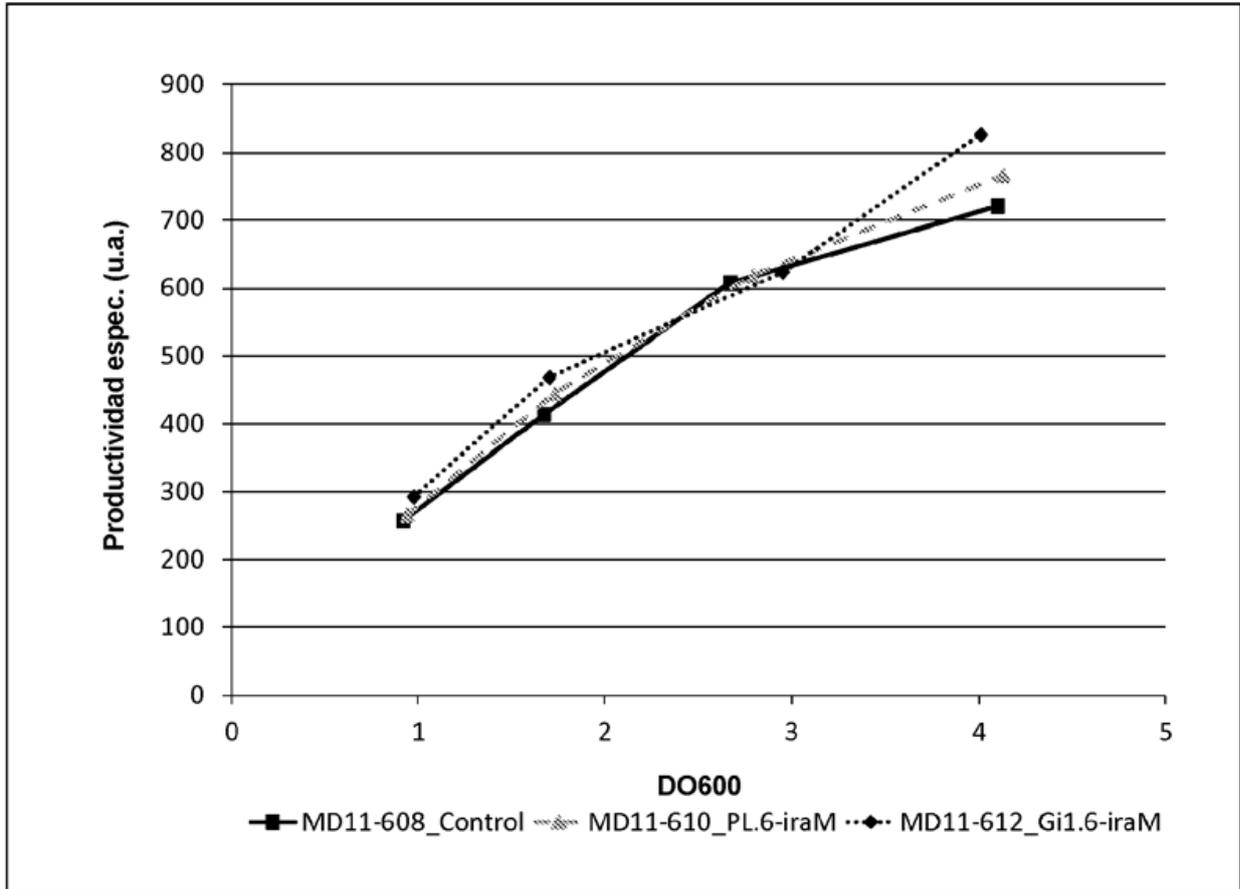


FIGURA 63:

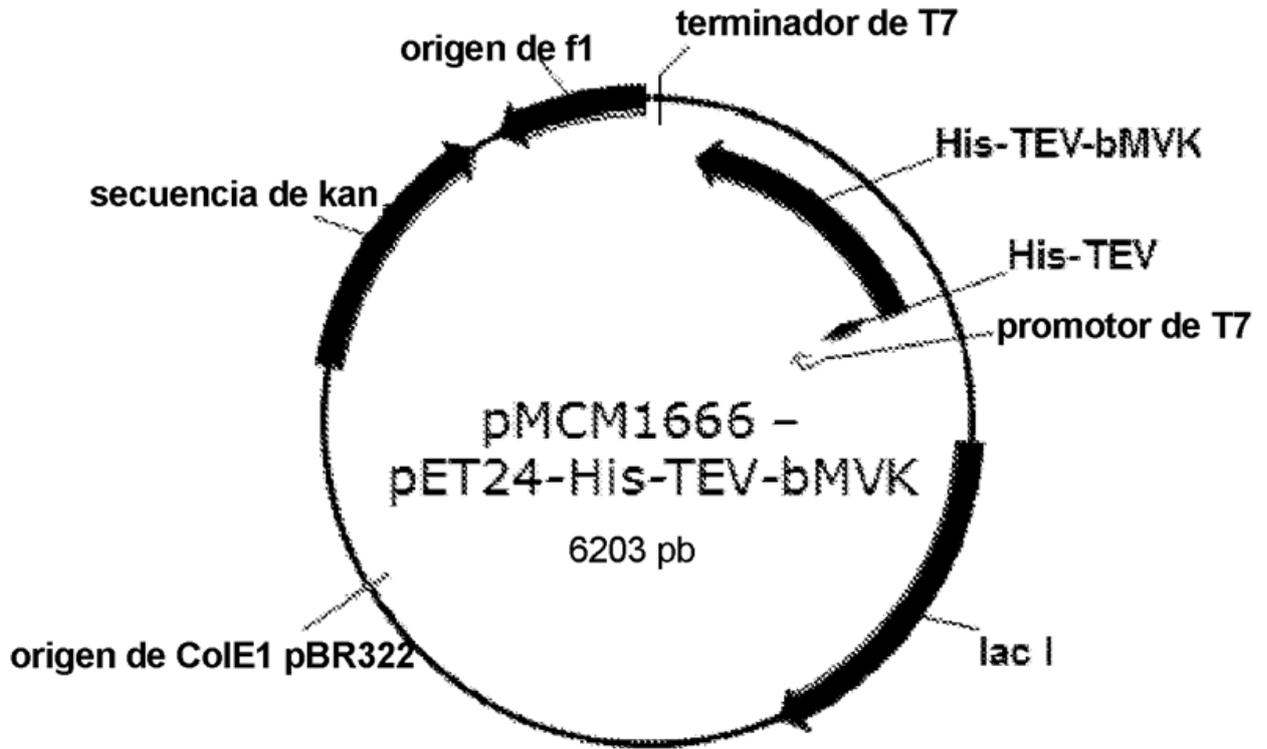


FIGURA 64:

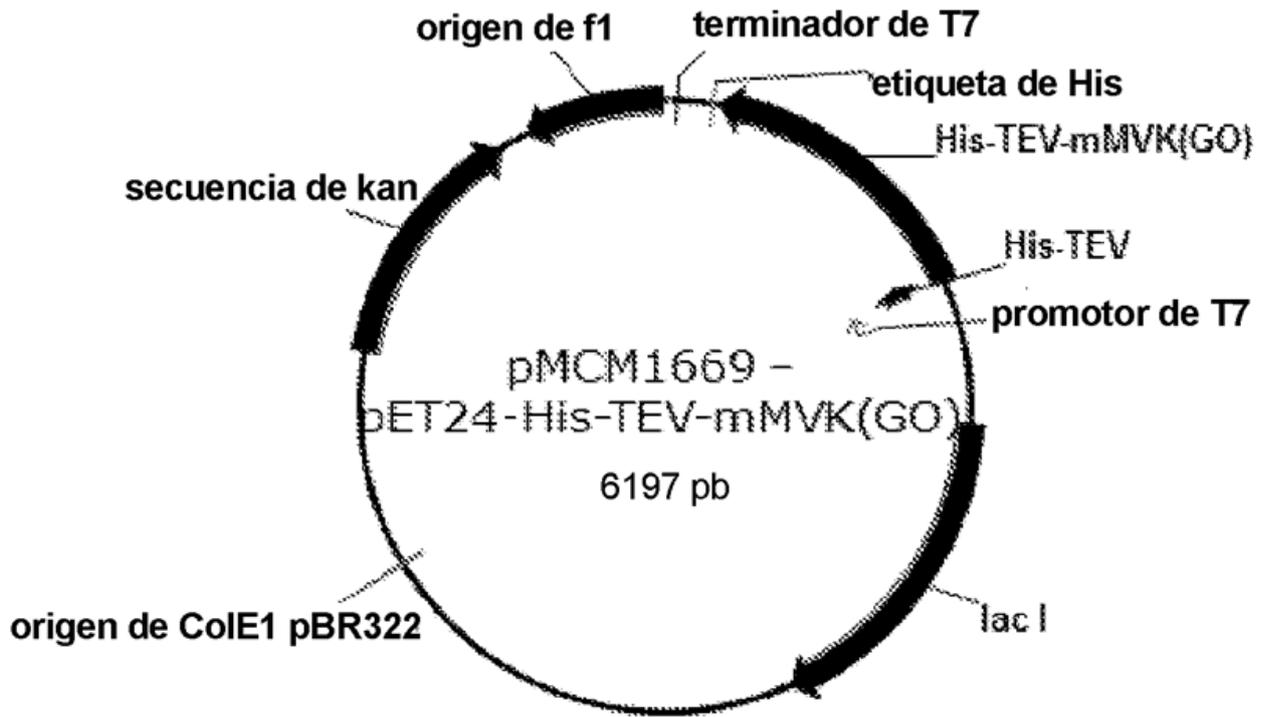


FIGURA 65:

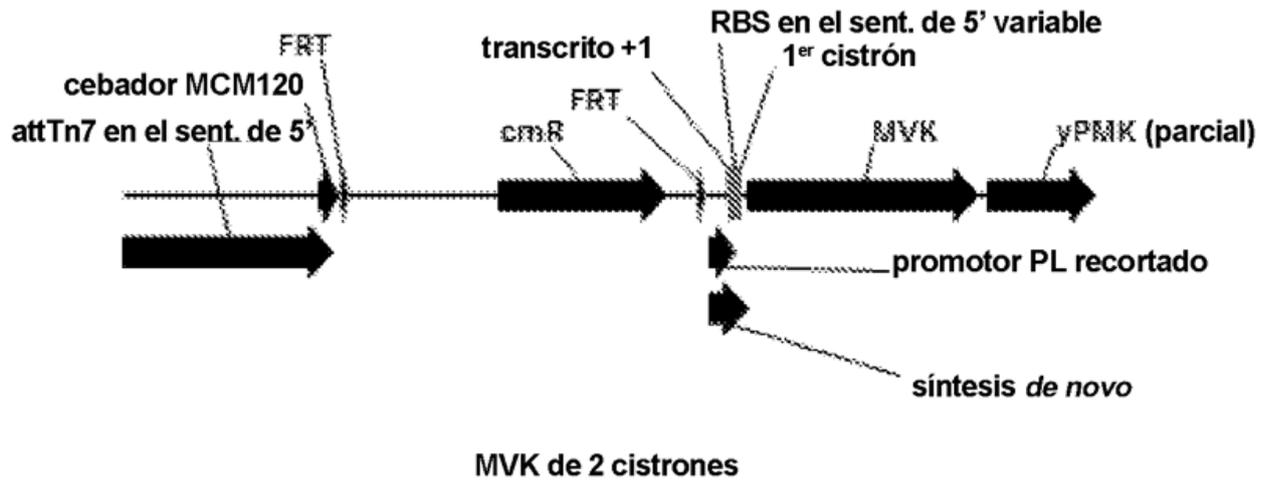


FIGURA 66:

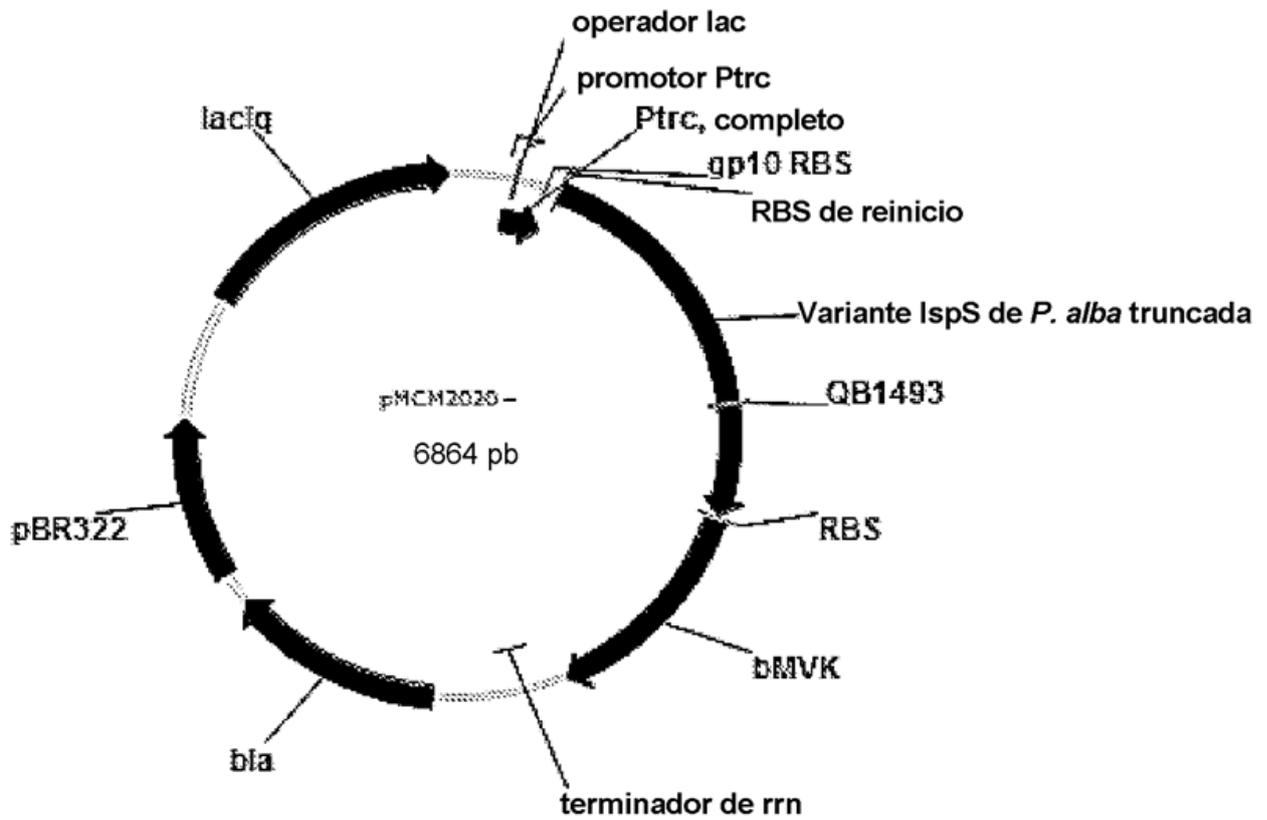


FIGURA 67:

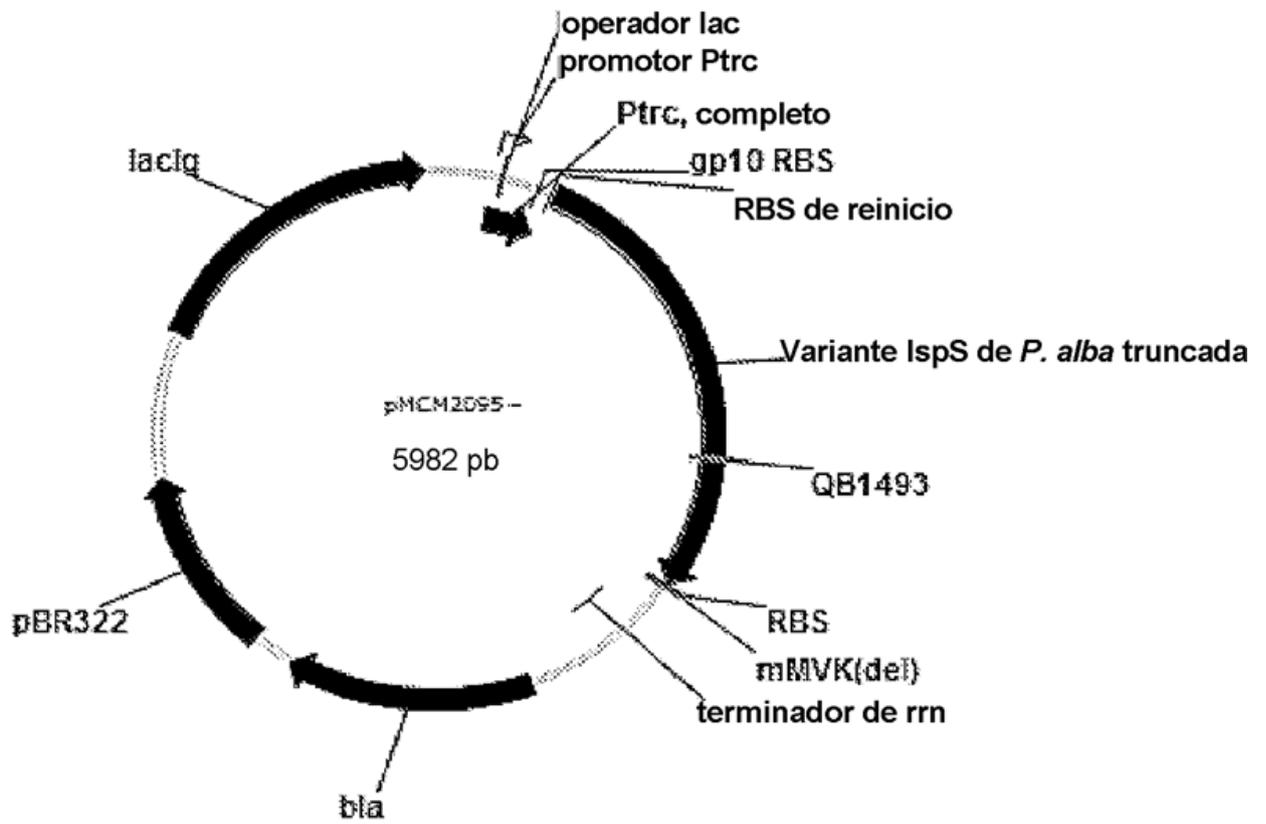


FIGURA 68:

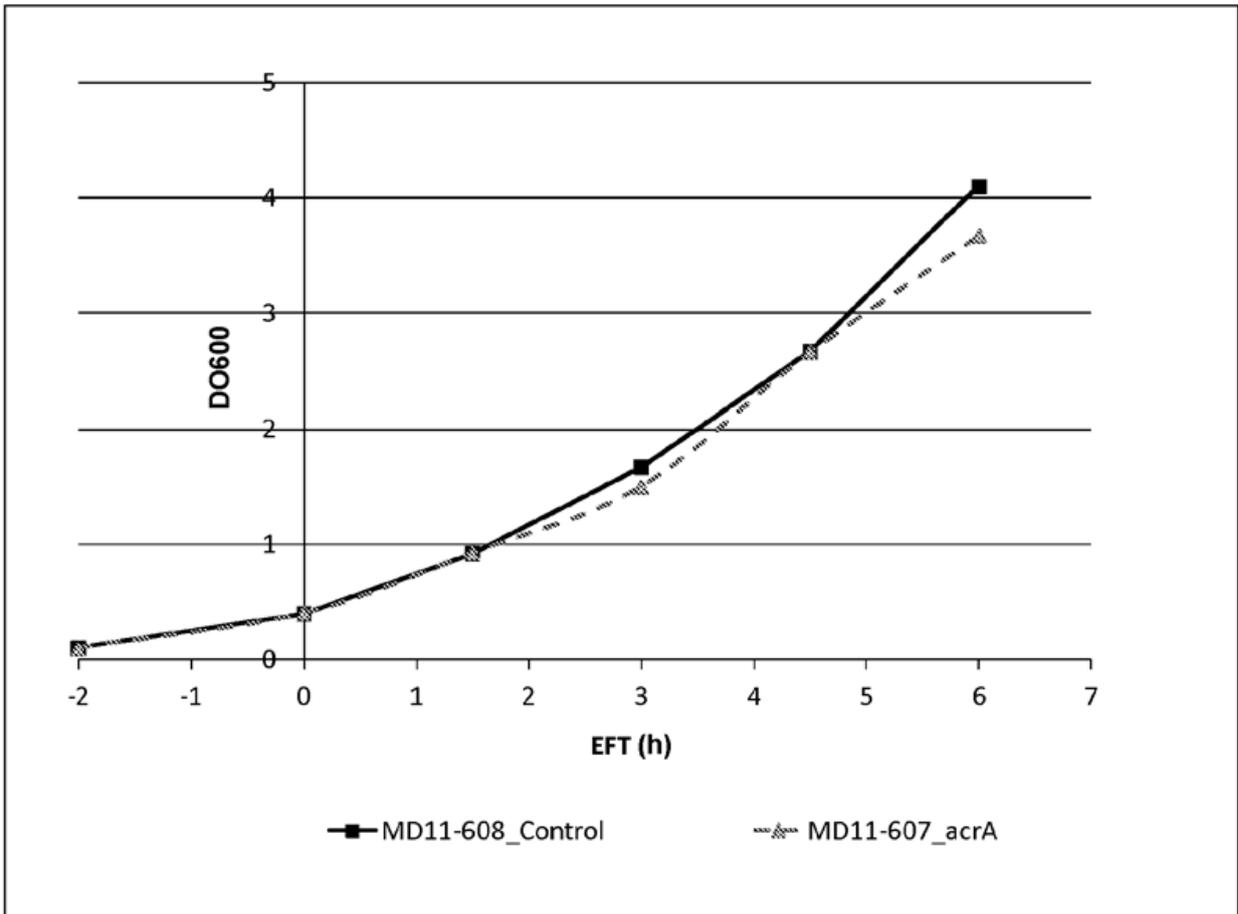


FIGURA 69:

