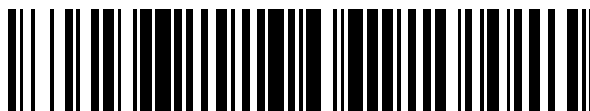


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 968**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2011** **E 11728895 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014** **EP 2591091**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de 1,3-propanodiol a partir de sacarosa**

30 Prioridad:

05.07.2010 EP 10305729

05.07.2010 US 361455 P

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

04.09.2014

73 Titular/es:

METABOLIC EXPLORER (100.0%)

Biopole Clermont-Limage

63360 Saint Beauzire, FR

72 Inventor/es:

SOUCAILLE, PHILIPPE y

BOISART, CÉDRIC

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 490 968 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

Procedimiento para la preparación de 1,3-propanodiol a partir de sacarosa.

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la preparación biológica de 1,3-propanodiol a partir de sacarosa, que comprende cultivar un microorganismo genéticamente modificado para la bioproducción de 1,3-propanodiol, en el que el microorganismo comprende una ruta metabólica de dos etapas para la producción de 1,3-propanodiol a partir de 4-hidroxi-2-cetobutirato, que comprende una primera etapa de descarboxilación y una segunda etapa de reducción, y en el que dicho microorganismo se ha modificado para que sea capaz de usar sacarosa como la única fuente de carbono.

Antecedentes

La producción fermentativa de 1,3-propanodiol cultivando microorganismo productor de 1,3-propanodiol es conocida en la técnica. Ya se han descrito procedimientos de producción de 1,3-propanodiol que implican enzimas dependientes de la vitamina B12; estos procedimientos hacen al procedimiento de producción muy caro.

Existe la necesidad continuada de soluciones alternativas para producir 1,3-propanodiol con una ruta independiente de la vitamina B12, a partir de fuentes renovables de carbono. Además, existe la necesidad continuada de la mejora del rendimiento global de producto que se produce, basado en la energía necesaria para tal producción. Finalmente, existe la necesidad continuada de controlar el nivel de impurezas y subproductos, para el aislamiento del producto y su comercialización y uso posterior.

El 1,3-propanodiol se produce principalmente a partir de glicerol (véase la solicitud de patente PCT/EP2010/056078) y a partir de glucosa vía el glicerol intermedio. Puesto que las existencias mundiales de glicerol son limitadas, existe la necesidad de hallar otras fuentes de hidratos de carbono.

Las fuentes de carbono usadas en medios de fermentación consisten generalmente en hidratos de carbono, derivados mayoritariamente de plantas. El almidón es el hidrato de carbono de almacenamiento más abundante en las plantas.

Puesto que el coste de las sustancias químicas primarias producidas biotecnológicamente está principalmente relacionado con el coste de la materia prima (es decir, el coste del sustrato de fermentación), el uso de azúcares refinados no es una elección económicamente sostenible para la producción a escala industrial. Se necesitan sustratos más baratos que retengan un contenido elevado de azúcar fermentable. A este respecto, la sacarosa que procede de la industria azucarera representa una buena opción.

La sacarosa se obtiene de plantas de azúcar tales como remolacha azucarera, caña de azúcar, sorgo dulce, arce azucarero, palmas azucareras o agaves azules. Los diferentes intermedios, productos o subproductos que contienen sacarosa procedentes de los procedimientos azucareros (zumo bruto, zumo depurado o aclarado, zumo espeso, jarabe de sacarosa, sacarosa pura, molasa) pueden servir como materia prima de la fermentación.

Se han caracterizado dos sistemas diferentes para la captación y utilización de sacarosa en microorganismos.

El primero se basa en un sistema de sacarosa fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) (PTS de sacarosa), en el que la sacarosa es captada y fosforilada usando fosfoenolpiruvato (PEP) como donante para producir sacarosa-6-fosfato intracelular. Sacarosa-6-fosfato se hidroliza entonces a D-glucosa-6-fosfato y D-fructosa mediante una invertasa. D-fructosa es fosforilada posteriormente a D-fructosa-6-fosfato mediante una fructocinasa dependiente de ATP, y después puede entrar al metabolismo central. Tal sistema se ha descrito en varias especies bacterianas, grampositivas así como también gramnegativas. Entre la familia de enterobacteriáceas, más del 90% de las cepas de *Klebsiella* de tipo salvaje pero menos del 50% de las cepas de *Escherichia* y menos del 10% de las cepas de *Salmonella* son positivas a sacarosa.

Se ha aislado de *Salmonella* (Schmid *et al.*, 1982, Schmid *et al.*, 1988) un plásmido conjugativo pUR400 que posee los genes scrKYABR que codifican el PTS de sacarosa.

Un segundo sistema, denominado "sistema no PTS", se descubrió más recientemente en *E. coli* EC3132 (Bockmann *et al.*, 1992). Este sistema implica los genes cscBKAR que codifican el sistema de transporte de simporte de sacarosa:protón (CscB), una fructocinasa (CscK), una invertasa (CscA) y un represor específico de la sacarosa (CscR).

Escherichia coli K12 y sus derivados no pueden utilizar sacarosa. Sin embargo, esta capacidad puede ser conferida mediante la transferencia de los genes que codifican los dos sistemas descritos previamente. Esto se ha demostrado transfiriendo el plásmido pUR400 en *E. coli* K12 (Schmid *et al.*, 1982), o diferentes plásmidos (incluyendo pKJL101-1) que poseen los genes cscBKAR en una cepa negativa a sacarosa de *E. coli* (Jahreis *et al.*, 2002). En cuanto a la aplicación industrial, se ha documentado la producción de triptófano a partir de sacarosa en *E. coli* K12 (Tsunekawa

et al., 1992), la producción de hidrógeno se mostró en *E. coli* que posee el plásmido pUR400 (Penfold y Macaskie, 2004), y en la solicitud de patente EP 1 149 911 se dio a conocer la producción de diferentes aminoácidos mediante la transferencia de ambos sistemas, PTS y no PTS.

- 5 Sorprendentemente, combinando modificaciones genéticas que conducen a una utilización de sacarosa en cepas de *E. coli* incapaces de utilizar sacarosa, y una ruta biosintética específica para 1,3-propanodiol, los inventores de la presente invención fueron capaces de obtener un rendimiento mejorado de la producción de 1,3-propanodiol a partir de una fuente de carbono renovable, la sacarosa.

10 Descripción general de la invención

La presente invención se refiere a un microorganismo genéticamente modificado para la bioproducción de 1,3-propanodiol a partir de sacarosa, en el que el microorganismo comprende:

- 15 - una ruta metabólica de dos etapas para la producción de 1,3-propanodiol, que comprende una primera etapa de descarboxilación de 4-hidroxi-2-cetobutirato con una enzima que tiene una actividad de 2-cetoácido descarboxilasa, y una segunda etapa de reducción del 3-hidroxi-2-oxopropanal obtenido con una enzima que tiene actividad de hidroxialdehído reductasa, y
- 20 - genes que permiten al microorganismo utilizar sacarosa como la única fuente de carbono.

Según la invención, el microorganismo contiene al menos un gen que codifica un polipéptido con actividad de 2-cetoácido descarboxilasa y un gen que codifica un polipéptido con actividad de hidroxialdehído reductasa. Esos genes pueden ser exógenos o endógenos, y pueden expresarse cromosómicamente o extracromosómicamente.

- 25 El microorganismo según la invención está además genéticamente modificado para permitir el uso de sacarosa como la única fuente de carbono.

30 Descripción detallada de la invención

- 30 Como se usa aquí, los siguientes términos se pueden usar para la interpretación de las reivindicaciones y de la memoria descriptiva.

- 35 El término "sacarosa" designa un disacárido de glucosa y fructosa enlazado mediante un enlace $\alpha(1,2)$ glucosídico, con la fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$. Su nombre sistemático es α -D-glucopiranosil-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-fructofuranósido.

- 40 La expresión "microorganismo genéticamente modificado" significa que el microorganismo de la invención no se encuentra en la naturaleza, y se modifica mediante introducción o mediante supresión de nuevos elementos genéticos. También se puede transformar forzando el desarrollo y evolución de nuevas rutas metabólicas al combinar mutagénesis dirigida y evolución bajo presión de selección específica (véase por ejemplo el documento WO 2004/076659).

- 45 Un microorganismo puede expresar genes exógenos si estos genes se introducen en el microorganismo con todos los elementos que permiten su expresión en el microorganismo hospedante. La transformación de microorganismos con ADN exógeno es una tarea habitual para el experto en la técnica.

- 50 Los genes exógenos se pueden integrar en el genoma hospedante, o se pueden expresar extracromosómicamente mediante plásmidos o vectores. El experto en la técnica conoce diferentes tipos de plásmidos, que difieren con respecto a su origen de replicación y su número de copias en la célula.

- 55 En realizaciones específicas, los genes endógenos también se pueden modificar para modular su expresión y/o actividad, introduciendo mutaciones en la secuencia codificante para modificar el producto génico, o introduciendo secuencias heterólogas además de o en sustitución de los elementos reguladores endógenos. La modulación de un gen endógeno puede producirse por ambas vías: aumentando y/o potenciando la actividad del producto génico por un lado, o disminuyendo y/o reduciendo la actividad del producto génico endógeno por otro lado.

- 60 Los elementos importantes para controlar la expresión de genes son los promotores. En una realización preferida de la invención, los genes se pueden expresar usando promotores con diferente fuerza, que pueden ser inducibles. Estos promotores pueden ser homólogos o heterólogos. El experto en la técnica sabe cómo escoger los promotores que son los más convenientes, por ejemplo se usan ampliamente promotores *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{lac}* o el promotor *lambda c1*.

- 65 Según la invención, "una enzima que tiene una actividad de 2-cetoácido descarboxilasa" designa una enzima que tiene una actividad descarboxilasa, cuyo sustrato es un 2-cetoácido. Los genes que codifican una actividad de 2-cetoácido descarboxilasa son bien conocidos en la técnica, incluyendo los genes *Pdc* procedentes de diversas especies, y más particularmente los genes *Pdc1*, *Pdc5*, *Pdc6*, *Aro10* y *Thi3* de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen

kivD de *Lactococcus lactis*; el gen pdc de *Clostridium acetobutylicum*; los genes Pdc2 y Pdc3 de *Arabidopsis thaliana*; los genes Pdc1, Pdc2 y Aro10 de *Pichia stipitis*; y el gen pdc de *Zymomonas mobilis*. La primera subunidad del complejo de 2-cetoglutarato descarboxilasa, codificado por el gen sucA de *Escherichia coli*, también posee actividad de 2-cetoácido descarboxilasa, así como la enzima codificada por el gen dxs de *Escherichia coli*. Los homólogos funcionales, las variantes funcionales y los fragmentos funcionales de dichos genes y proteínas están englobados por la definición.

Según la invención, “una enzima que tiene una actividad de hidroxilaldehído reductasa” designa una enzima que tiene una actividad de reductasa, cuyo sustrato es un hidroxilaldehído. Los genes que codifican una actividad de hidroxilaldehído reductasa son bien conocidos en la técnica, incluyendo los genes yqhD, fucO, dkgA, dkgB de *Escherichia coli*, y los genes ADH1 y ADH2 de *Saccharomyces cerevisiae*. Los homólogos funcionales, las variantes funcionales y los fragmentos funcionales de dichos genes y proteínas están englobados por la definición.

La expresión “para utilizar sacarosa como la única fuente de carbono” indica que el microorganismo puede crecer en un medio que contiene sacarosa como única fuente de carbono. Sin embargo, se entiende que en el procedimiento para producir 1,3-propanodiol según la invención, la fuente de sacarosa en el medio de cultivo puede comprender fuentes de carbono adicionales además de sacarosa, tales como hexosas (tales como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, disacáridos (tales como sacarosa, celobiosa o maltosa), oligosacáridos, almidón o sus derivados, hemicelulosas, glicerol y sus combinaciones.

En una realización específica de la invención, el microorganismo comprende genes funcionales que codifican un sistema de utilización de sacarosa PTS y/o un sistema de utilización de sacarosa no PTS.

Un sistema de utilización de sacarosa mediante PTS es un sistema para la utilización de sacarosa basado en el transporte de sacarosa por un sistema de sacarosa fosfotransferasa (PTS de sacarosa) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP). Un sistema de fosfotransferasa acopla el transporte de un azúcar (por ejemplo sacarosa o glucosa) con la fosforilación del azúcar usando PEP como dador de fosfato. Tras el transporte a la célula, el fosfato de sacarosa se escinde en glucosa-6-fosfato y fructosa mediante una invertasa. La fructosa se fosforila entonces en fructosa-6-fosfato por una fructocinasa. Los genes que codifican este sistema de utilización de sacarosa mediante PTS se puede controlar mediante una proteína reguladora.

Un sistema de utilización de sacarosa sin PTS es un sistema para la utilización de sacarosa basado en transporte de sacarosa mediante un sistema independiente de fosfoenolpiruvato. Tras el transporte a la célula, la sacarosa se escinde en glucosa y fructosa mediante una invertasa. La fructosa se fosforila entonces en fructosa-6-fosfato mediante una fructocinasa, y la glucosa se fosforila en glucosa-6-fosfato mediante una glucocinasa. Los genes que codifican este sistema de utilización de sacarosa sin PTS se pueden controlar mediante una proteína reguladora.

En un aspecto específico de la invención, el microorganismo se expresa de forma natural o se ha modificado con la introducción de los genes: *scrKYABR* (*scrK* que codifica una fructocinasa, *scrY* que codifica una porina, *scrA* que codifica la Proteína IIBC, *scrB* que codifica una sacarosa-6-P-invertasa, *scrR* que codifica un represor) de *Salmonella*. Para transformar el microorganismo, se puede usar un plásmido conjugativo pUR400 que posee dichos genes *scrKYABR*. Estos genes se pueden usar todos juntos en combinación, o en cualquier combinación que comprenda al menos uno de estos genes. En particular, el gen *scrR* se puede omitir.

En otro aspecto específico de la invención, el microorganismo se expresa de forma natural o se ha modificado con la introducción de los genes de *E. coli* EC3132, es decir, los genes *cscBKAR* que codifican un sistema de transporte de simporte de sacarosa:protón (*cscB*), una fructocinasa (*cscK*), una invertasa (*cscA*), y un represor específico de la sacarosa (*cscR*). Estos genes se pueden usar todos juntos en combinación, o en cualquier combinación que comprenda al menos uno de estos genes. En particular, el gen *cscR* se puede omitir. También se pueden usar genes homólogos procedentes de otros organismos.

La designación de estos genes tiene un significado más general según la invención, y cubre los genes correspondientes en otros microorganismos. Usando las referencias de GenBank de los genes procedentes de *Salmonella* o de *E. coli*, los expertos en la técnica pueden determinar genes equivalentes en organismos distintos de *Salmonella* o *E. coli*.

Los medios de identificación de las secuencias homólogas y sus porcentajes de homología son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen en particular los programas BLAST que se pueden usar en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros por defecto indicados en ese sitio web. Las secuencias obtenidas se pueden explotar (alinear) usando, por ejemplo, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), con los parámetros por defecto indicados en estos sitios web.

La base de datos PFAM (base de datos de familias de proteínas de alineamientos y modelos de Markov ocultos <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) es una gran colección de alineamientos de secuencias proteicas. Cada PFAM hace posible visualizar múltiples alineamientos, ver dominios proteicos, evaluar distribuciones entre organismos, obtener acceso a otras bases de datos, y visualizar estructuras proteicas conocidas.

Los COG (agrupamientos de grupos ortólogos de proteínas <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen comparando secuencias proteicas derivadas de 66 genomas unicelulares completamente secuenciados que representan 14 líneas filogenéticas principales. Cada COG se define a partir de al menos tres líneas, haciendo posible identificar dominios conservados arcaicos.

Varias técnicas se usan actualmente por el experto en la técnica para introducir ADN en una cepa bacteriana. Una técnica preferida es la electroporación, que es bien conocida por los expertos en la técnica.

Según una realización específica de la invención, el microorganismo comprende un gen endógeno que codifica una actividad de 2-cetoácido descarboxilasa. Dicho microorganismo se selecciona preferentemente de entre *Saccharomyces cerevisiae* (que comprende los genes Pdc1, Pdc5, Pdc6, Aro10, Thi3); *Lactococcus lactis* (Kivd); *Clostridium acetobutylicum* (Pdc); *Pichia stipitis* (Pdc 1, Pdc2, Aro 10); *Zymomonas mobilis* (Pdc); *Mycobacterium tuberculosis*.

En una realización preferida de la invención, la expresión del gen endógeno que codifica la 2-cetoácido descarboxilasa está potenciada en dicho microorganismo.

Según otra realización de la invención, el microorganismo no comprende un gen endógeno que codifica una 2-cetoácido descarboxilasa. Dicho microorganismo que carece de 2-cetoácido descarboxilasa endógena se selecciona preferentemente de entre *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum* o *Bacillus subtilis*. Para tales microorganismos, el microorganismo de la invención comprende un gen heterólogo que codifica una 2-cetoácido descarboxilasa. Los genes que codifican una actividad de 2-cetoácido descarboxilasa incluyen genes Pdc procedentes de diversas especies, y más particularmente los genes Pdc1, Pdc5, Pdc6, Aro10 y los genes Thi3 de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen kivD de *Lactococcus lactis*; el gen pdc de *Clostridium acetobutylicum*; los genes Pdc2 y Pdc3 de *Arabidopsis thaliana*; los genes Pdc1, Pdc2 y Aro10 de *Pichia stipitis*; y el gen pdc de *Zymomonas mobilis*. La primera subunidad del complejo de 2-cetoglutarato descarboxilasa, codificado por el gen sucA de *Escherichia coli*, también posee actividad de 2-cetoácido descarboxilasa, así como la enzima codificada por el gen dxs de *Escherichia coli*.

Según otra realización de la invención, el microorganismo comprende un gen endógeno que codifica una actividad de hidroxil aldehído reductasa. Preferentemente se selecciona de entre *Escherichia coli* (yqhD, fucO, dkgA, dkgB); *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2); y todos los organismos que tienen al menos una enzima que tiene actividad de aldehído reductasa o actividad de alcohol deshidrogenasa. Este microorganismo que tiene actividad endógena de hidroxil aldehído reductasa se puede modificar adicionalmente para potenciar la expresión del gen endógeno que codifica la hidroxil aldehído reductasa.

En una realización específica, el microorganismo comprende un gen heterólogo que codifica una actividad de hidroxil aldehído reductasa. Los genes que codifican una actividad de hidroxil aldehído reductasa incluyen los genes yqhD, fucO, dkgA, dkgB de *Escherichia coli*, y los genes ADH1 y ADH2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Según otra realización de la invención, el microorganismo se ha modificado genéticamente para la producción mejorada de 4-hidroxil-2-cetobutirato a partir de sacarosa. Este resultado se puede lograr incrementando la expresión de homoserina transaminasa u homoserina oxidasa. Estas enzimas permiten la conversión de L-homoserina (obtenida de L-aspartato) en 4-hidroxil-2-cetobutirato. El incremento de la expresión de homoserina oxidasa se puede lograr introduciendo y sobreexpresando el gen que codifica L-aminoácido oxidasa a partir de *R. opacus*, o introduciendo mutaciones en el gen que incrementa la actividad de la proteína correspondiente. El incremento del nivel de expresión de homoserina transaminasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que conducen la expresión del gen *serC* de *E. coli*, incrementando el número de copias en la célula, o introduciendo mutaciones en el gen *serC* que incrementan la actividad de la proteína correspondiente.

En la figura 1 se representa la ruta biosintética global de 1,3-propanodiol.

En otra realización, el microorganismo presenta un flujo estimulado en la ruta de la biosíntesis de oxaloacetato; este resultado se puede lograr incrementando el nivel de expresión de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, codificada por el gen *ppc*. El incremento del nivel de expresión de la fosfoenolpiruvato carboxilasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que conducen la expresión del gen *ppc*, incrementando el número de copias en la célula, o introduciendo mutaciones en el gen *ppc* que incrementa la actividad de la proteína correspondiente. El incremento del conjunto de oxaloacetato también se puede lograr incrementando el nivel de expresión de la piruvato carboxilasa exógena, codificada por el gen *pyc* de *Rhizobium etli* o *Corynebacterium glutamicum*. El incremento del nivel de expresión de la piruvato carboxilasa se puede lograr sobreexpresando estos genes, cromosómica o extracromosómicamente. Específicamente en condiciones anaerobias, el incremento del conjunto de oxaloacetato también se puede lograr incrementando el nivel de expresión de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, codificada por el gen *pckA*. El incremento del nivel de expresión de la piruvato carboxilasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que conducen la expresión del gen *pckA*, incrementando el número de copias en la célula, o introduciendo mutaciones en el gen *pckA* que incrementan la actividad de la proteína correspondiente. La disponibilidad del

producto intermedio oxaloacetato también se puede incrementar atenuando el nivel de expresión de genes que codifican fosfoenolpiruvato carboxilasa y/o enzimas málicas, codificadas por los genes *pckA* y/o *sfcA* o *maeB*, respectivamente. Esto se puede realizar sustituyendo el promotor de tipo salvaje de estos genes mediante un promotor de menor potencia, o mediante el uso de un elemento que desestabiliza el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa de los genes también se puede lograr mediante una supresión de las secuencias de ADN correspondientes.

En otra realización, el microorganismo presenta un flujo estimulado en la ruta biosintética de homoserina. Esto se puede lograr incrementando la expresión de aspartocinasa y homoserina deshidrogenasa y/o aspartato semialdehído deshidrogenasa, codificadas por los genes *thrA/metL* y *asd*, respectivamente. El incremento de la expresión de aspartocinasa y homoserina deshidrogenasa y/o aspartato semialdehído deshidrogenasa se puede lograr introduciendo promotores artificiales que conducen la expresión de los genes *thrA/metL* y/o *asd*, incrementando el número de copias en la célula, o introduciendo mutaciones en los genes *thrA* y/o *asd* que incrementan la actividad de las proteínas correspondientes.

En una realización particular de la invención, se puede introducir mutaciones en el gen *thrA* que reducen su sensibilidad a la treonina retroinhibidora de la alimentación (alelos desensibilizados de la retroalimentación), y de este modo permiten una mayor actividad en presencia de treonina.

En una realización adicional de la invención, el microorganismo se modifica para presentar un nivel atenuado de conversión de homoserina en otros compuestos distintos de 1,3-propanodiol. Este resultado se puede lograr atenuando el nivel de enzimas que consumen homoserina, como homoserina cinasa y treonina sintasa (codificada por *thrB* y *thrC*), homoserina O-transsuccinilasa (codificada por *metA*). Estos genes se pueden atenuar sustituyendo el promotor natural por un promotor más débil o por elementos que desestabilizan el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen también se puede lograr mediante la supresión de la secuencia de ADN correspondiente.

En una realización adicional de la invención, la bacteria se modifica para presentar un nivel atenuado de conversión de precursores de homoserina en otros compuestos distintos de 3-hidroxipropionato; este resultado se puede lograr atenuando el nivel de dihidrodipicolinato sintasa (codificada por *dapA*). La atenuación de este gen se puede realizar sustituyendo el promotor natural por un promotor de menor potencia o por un elemento que desestabiliza el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen también se puede lograr mediante una supresión de la secuencia de ADN correspondiente. La invención también se refiere a la bacteria usada en esta realización particular de la invención.

En una realización adicional de la invención, el microorganismo se modifica para presentar un nivel atenuado de conversión de 3-hidroxipropionaldehído en otros compuestos distintos de 1,3-propanodiol. Esto se puede lograr atenuando el nivel de enzimas que consumen 3-hidroxipropionaldehído, como 3-hidroxipropionaldehído deshidrogenasa (codificada por *aldA*, *aldB*, *aldH*). Estos genes se pueden atenuar sustituyendo el promotor natural por un promotor más débil o por elementos que desestabilizan el ARN mensajero correspondiente o la proteína. Si es necesario, la atenuación completa del gen también se puede lograr mediante la supresión de la secuencia de ADN correspondiente.

Todas las técnicas para transformar los microorganismos, y los elementos reguladores usados para potenciar la producción de la proteína de la invención, son bien conocidos en la técnica y están disponibles en la bibliografía, incluyendo las solicitudes de patente propias del solicitante sobre la modificación de las rutas biosintéticas en diversos microorganismos, incluyendo los documentos WO 2008/052973, WO 2008/052595, WO 2008/040387, WO 2007/144346, WO 2007/141316, WO 2007/077041, WO 2007/017710, WO 2006/082254, WO 2006/082252, WO 2005/111202, WO 2005/073364, WO 2005/047498, WO 2004/076659, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia.

Como se describe previamente, la designación de estos genes tiene un significado más general según la invención, y cubre los genes correspondientes en otros microorganismos.

Según la invención, el término "microorganismo" designa una bacteria, levadura o un hongo. Preferentemente, el microorganismo se selecciona de entre *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* y *Corynebacteriaceae*. Más preferentemente, el microorganismo es una especie de *Escherichia*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella* o *Corynebacterium*. Incluso más preferentemente, el microorganismo es la especie *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum* o *Clostridium acetobutylicum* o *Bacillus subtilis*.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción fermentativa de 1,3-propanodiol a partir de sacarosa, que comprende las etapas siguientes:

- cultivar un microorganismo según la invención en un medio de cultivo apropiado que comprende sacarosa, y
- recuperar 1,3-propanodiol a partir del medio de cultivo.

La fermentación se realiza generalmente en fermentadores con un medio de cultivo apropiado adaptado al microorganismo, que contiene sacarosa, y si es necesario co-sustratos.

Un "medio de cultivo apropiado" designa un medio (por ejemplo, un medio líquido estéril) que comprende nutrientes esenciales o beneficiosos al mantenimiento y/o crecimiento de la célula, tales como fuentes de carbono o sustrato de carbono, fuentes de nitrógeno, por ejemplo peptona, extractos de levadura, extractos de carne, extractos de malta, urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y fosfato de amonio; fuentes de fósforo, por ejemplo fosfato monopotásico o fosfato dipotásico; oligoelementos (por ejemplo, sales metálicas), por ejemplo sales de magnesio, sales de cobalto y/o sales de manganeso; así como factores de crecimiento tales como aminoácidos, vitamina, promotores del crecimiento, y similares.

Como ejemplo de medios de cultivo conocidos para *E. coli*, el medio de cultivo puede ser de composición idéntica o similar a un medio M9 (Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128), un medio M63 (Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York), o un medio tal como el definido por Schaefer *et al.* (1999, Anal. Biochem. 270: 88-96).

Las condiciones de cultivo para el procedimiento de fermentación se pueden definir fácilmente por aquellos expertos en la técnica. En particular, las bacterias se fermentan a temperaturas entre 20°C y 55°C, preferentemente entre 25°C y 40°C, y preferentemente a alrededor de 35°C para clostridiáceas, y a alrededor de 37°C para enterobacteriáceas.

Según la invención, los términos "cultivar", "cultivo", "crecimiento" y "fermentación" se usan de forma intercambiable para representar el crecimiento de bacterias en un medio de crecimiento apropiado que contiene una fuente de carbono simple. La fermentación es un proceso clásico que se puede llevar a cabo en condiciones aerobias, microaerobias o anaerobias.

"En condiciones aerobias" significa que se proporciona oxígeno al cultivo al disolver el gas en la fase líquida. Esto se podría obtener (1) rociando gas que contiene oxígeno (por ejemplo aire) en la fase líquida, o (2) agitando la vasija que contiene el medio de cultivo a fin de transferir el oxígeno contenido en el espacio superior a la fase líquida. Las ventajas de la fermentación en condiciones aerobias en lugar de condiciones anaerobias son que la presencia de oxígeno como aceptor de electrones mejora la capacidad de la cepa para producir más energía en forma de ATP para procesos celulares. Por lo tanto, la cepa mejora su metabolismo general.

Las condiciones microaerobias se definen como condiciones de cultivo en las que se disuelven en la fase líquida bajos porcentajes de oxígeno (por ejemplo usando una mezcla de gas que contiene entre 0,1 y 10% de oxígeno, completado hasta 100% con nitrógeno).

Las condiciones anaerobias se definen como condiciones de cultivo en las que no se proporciona oxígeno al medio de cultivo. Las condiciones estrictamente anaerobias se obtienen rociando un gas inerte como nitrógeno en el medio de cultivo para eliminar trazas de otro gas. El nitrato se puede usar como un aceptor de electrones para mejorar la producción de ATP por la cepa y mejorar su metabolismo.

En un aspecto específico de la invención, la sacarosa se obtiene de biomasa, en particular de biomasa vegetal. Se puede usar toda la planta o cualquier parte específica de una planta para preparar la materia prima usada como medio que contiene sacarosa. La preparación se puede basar en cualquier tratamiento conocido por los expertos en la técnica para extraer sacarosa a partir de una biomasa vegetal que contiene sacarosa.

En un aspecto preferido de la invención, el medio que contiene sacarosa se obtiene a partir de una planta escogida entre el grupo que consiste en: caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce, arce de azúcar, palma de azúcar y agave azul.

Preferentemente, el medio que contiene sacarosa se obtiene de caña de azúcar o remolacha azucarera.

Se pueden usar diferentes formas de medio que contiene sacarosa: un zumo, un zumo concentrado, un jarabe, un zumo aclarado, molasas, o sacarosa cristalizada. Una forma preferida es el zumo bruto a partir de caña de azúcar, extraído directamente de la planta sin ningún tratamiento. De forma breve, la caña de azúcar cosechada se limpia antes del proceso de molienda para la extracción del zumo. La estructura de la caña se rompe y después se muele, y al mismo tiempo la sacarosa se extrae con agua para obtener el zumo bruto. El zumo bruto se puede aclarar entonces añadiendo cal y calentando, y el zumo aclarado se separa del precipitado. El jarabe concentrado se obtiene mediante evaporación.

Puesto que algunos medios brutos que contienen sacarosa, particularmente aquellos obtenidos de biomasa como se menciona anteriormente, contienen otros nutrientes que se pueden usar para el crecimiento de microorganismos además del medio que contiene sacarosa, un medio apropiado para el crecimiento de microorganismos se puede diseñar usando el medio que contiene sacarosa solo, es decir, el medio apropiado consiste en el medio que contiene

sacarosa, o complementando el medio que contiene sacarosa con una fuente de fósforo y/o una fuente de nitrógeno.

Preferentemente, el medio que contiene sacarosa comprende al menos 7% de sacarosa.

5 En un aspecto de la invención, el 1,3-propanodiol recuperado se purifica adicionalmente. La recuperación de 1,3-propanodiol del medio de cultivo es una tarea habitual para un experto en la técnica. Los procedimientos para la recuperación y purificación se describen en las siguientes solicitudes de patente: WO 2009/068110 y WO 2010/037843.

10 Antes de describir la presente invención con detalle, se ha de entender que esta invención no está limitada a los procedimientos particularmente ejemplificados, y por supuesto puede variar. En particular, los ejemplos muestran cepas de *Escherichia coli* modificadas, pero estas modificaciones se pueden llevar a cabo fácilmente sobre otros microorganismos de la misma familia.

15 *Escherichia coli* pertenece a la familia de enterobacteriáceas, que comprende miembros que son gramnegativos, con forma de varilla, que no forman esporas, y tienen típicamente una longitud de 1-5 μm . La mayoría de los miembros tienen flagelos usados para moverse, pero unos pocos géneros no son móviles. Muchos miembros de esta familia son una parte normal de la flora intestinal encontrada en los intestinos de seres humanos y otros animales, mientras que otros se encuentran en el agua o en el suelo, o son parásitos en una variedad de diferentes animales y plantas.

20 *Escherichia coli* (*E. coli*) es uno de los organismos modelo más importantes, pero también se pueden citar como miembros importantes de la familia de enterobacteriáceas: *Klebsiella*, en particular *Klebsiella pneumoniae*, y *Salmonella*.

Dibujos

25 Figura 1. Ruta biosintética del 1,3-propanodiol a partir de sacarosa.

Ejemplos

Ejemplo 1

Cálculo de rendimientos máximos para la producción de 1,3-propanodiol en glucosa y sacarosa

1.1 - Parámetros usados para simulaciones

35 Las simulaciones se llevaron a cabo en el software patentado de METEX METOPT™. Se usó una red metabólica simplificada de *E. coli*, incluyendo una red metabólica central, rutas metabólicas para todos los precursores de biomasa, y rutas de producción específicas como se describe anteriormente. Se usó una composición de biomasa clásica para *E. coli*. Las simulaciones se llevaron a cabo usando la fuente de carbono de glucosa o sacarosa. Para la utilización de sacarosa, se modelaron tanto el sistema PTS como el sistema no PTS. Puesto que no hubo diferencias en los rendimientos máximos calculados, sólo se da a conocer un rendimiento en sacarosa. Se llevó a cabo el cálculo de un rendimiento máximo práctico, teniendo en cuenta una velocidad de crecimiento de 0,1 h^{-1} y una energía de mantenimiento de 5 $\text{mmol}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_{\text{DW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Todas las simulaciones se llevaron a cabo con una velocidad de captación específica de glucosa de 3 $\text{mmol}_{\text{g}_{\text{DW}}^{-1}} \cdot \text{h}^{-1}$. Las simulaciones se llevaron a cabo en condiciones aerobias.

1.2 - Resultados de la simulación

	1,3-propanodiol en glucosa	1,3-propanodiol en sacarosa
Rendimiento práctico máximo (g/g)	0,38	0,41

Ejemplo 2

50 Demostración de la actividad de L-homoserina transaminasa codificada por el gen *serC* de *Escherichia coli*

2.1 - Construcción de la cepa para la caracterización de SerC:BL21 (pPAL7-*serC*)

55 Para caracterizar la proteína SerC, se expresó el gen correspondiente a partir del vector de expresión pPAL7 (Bio-rad).

Para este fin, el gen *serC* se amplificó a partir del genoma de *E. coli* usando los oligonucleótidos pPAL7-*serC* F y pPAL7-*serC* R. El producto PCR se restringió usando las enzimas *Hind*III y *Eco*RI y se clonó en el vector pPAL7, restringido por las mismas enzimas de restricción. El vector resultante se denominó pPAL7-*serC*.

pPAL7-*serC* F (SEC ID nº 1):

cccAAGCTTtgATGGCTCAAATCTTCAATTTAGTTCTGG

con

- una región (letra negrita) homóloga a la secuencia (956876 - 956904) del gen *serC* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra subrayada) que posee el sitio de restricción *HindIII*

pPAL7-serC R (SEC ID nº 2):

gGAATTC**TTAACCGTGACGGCGTTCGAACTCAACC**

con

- una región (letra negrita) homóloga a la secuencia (957964 - 957937) de la región del gen *serC* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra subrayada) que posee el sitio de restricción *EcoRI*.

El plásmido pPAL7-serC se introdujo entonces en células BL21 (DE3) competentes (Invitrogen).

2.2 - Sobreproducción de la proteína SerC

La sobreproducción de la proteína SerC se realizó en un matraz Erlenmeyer de 2 l, usando caldo LB (Bertani, 1951, J. Bacteriol. 62:293-300) que se suplementó con 2,5 g/l de glucosa y 100 mg/l de ampicilina. Se hizo crecer un precultivo toda la noche en un matraz Erlenmeyer de 500 ml lleno con 50 ml de caldo LB que se suplementó con 2,5 g/l de glucosa y 100 mg/l de ampicilina. El precultivo se usó para inocular un cultivo de 500 ml hasta una OD_{600nm} de alrededor de 0,15. El cultivo se hizo crecer en primer lugar a 37°C y 200 rpm hasta que la OD_{600 nm} fue de alrededor de 0,5, y después se movió a 25°C y 200 rpm y se hizo crecer hasta que la OD_{600 nm} fue 0,6-0,8 (alrededor de una hora) antes de la inducción con IPTG 500 µM. El cultivo se mantuvo a 25°C y 200 rpm hasta que OD_{600 nm} fue alrededor de 4, y después se detuvo. Las células se centrifugaron a 7000 rpm durante 5 minutos a 4°C, y después se almacenaron a -20°C.

2.3 - Purificación de la proteína SerC

2.3.1 - Etapa 1: Preparación de extractos libres de células.

Se suspendieron alrededor de 280 mg de biomasa de *E. coli* en 45 ml de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6, y un cóctel de inhibidores de proteasas. La suspensión celular (15 ml por tubo cónico) se sometió a ultrasonidos en hielo (Bandelin sonoplus, 70 W) en un tubo cónico de 50 ml durante 8 ciclos de 30 s, con intervalos de 30 s. Después del tratamiento con ultrasonidos, las células se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente con MgCl₂ 5 mM y 1 U/ml de DNaseI. El desecho celular se eliminó mediante centrifugación a 12000 g durante 30 min. a 4°C.

2.3.2 - Etapa 2: Purificación por afinidad

La proteína se purificó a partir del extracto celular bruto mediante afinidad en una columna Profinity (BIORAD, cartucho Bio-Scale Mini Profinity exact, 5 ml) según el protocolo recomendado por el fabricante. El extracto bruto se cargó en un cartucho de 5 ml Profinity exact equilibrado con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna del mismo tampón y se incubó 30 min. con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6, fluoruro 100 mM a temperatura ambiente. La proteína se eluyó de la columna con 2 volúmenes de columna de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La etiqueta permaneció fuertemente unida a la resina y la proteína purificada se liberó. Las fracciones que contienen la proteína se reunieron y se dializaron frente a Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM y glicerol al 10% pH 8.

La concentración de proteína se midió usando el ensayo de proteína de Bradford.

2.4 - Ensayo de L-homoserina transaminasa

La actividad de L-homoserina transaminasa se midió a 30°C usando un ensayo enzimático acoplado. El ensayo de la actividad de L-homoserina transaminasa se llevó a cabo con tampón de fosfato potásico 420 mM pH 8,2, acetilpiridina adenina dinucleótido 2 mM, L-homoserina 3 mM, deshidrogenasa glutámica 20 unidades/ml procedente de hígado bovino, ácido alfa-cetoglutarico 1 mM neutralizado, y alrededor de 50 µg de extracto bruto en un volumen total de 1 ml. El consumo de acetilpiridina adenina dinucleótido se monitorizó a 375 nm en un espectrofotómetro. La actividad detectada en el ensayo de control, que carece del sustrato (L-homoserina), se restó de la actividad detectada en el ensayo con sustrato. Una unidad de actividad de L-homoserina transaminasa es la cantidad de enzima requerida para catalizar la transaminación de 1 µmol de L-homoserina por min. a 30°C. (Épsilon 375 nm =

6100 M-1 cm-1).

2.5 - Actividad de la enzima purificada

	Actividad de enzima purificada (mUI/mg)
Ensayo de L-homoserina transaminasa	118

Ejemplo 3

Demostración de la actividad de 4-hidroxi-2-cetobutirato descarboxilasa codificada por el gen *kivD* de *Lactococcus lactis*

3.1 - Construcción de la cepa para la caracterización de KivD:BL21 (pPAL7-kivDII)

Para caracterizar la proteína KivD, se expresó el gen correspondiente a partir del vector de expresión pPAL7 (Bio-rad).

Para este fin, el gen *kivD* se amplificó a partir del genoma de *Lactococcus lactis* usando los oligonucleótidos pPAL7-kivDII F y pPAL7-kivDII R. El producto de la PCR se restringió usando las enzimas *HindIII* y *EcoRI*, y se clonó en el vector pPAL7, restringido por las mismas enzimas de restricción. El vector resultante se denominó pPAL7-kivDII.

pPAL7-kivDII F (SEC ID nº 3):

cccAAGCTTtg**ACTTCT**ATGTATACCGTGGGTGATTATC

con

- una región (letra cursiva) homóloga a la secuencia del gen sintético del gen *kivD* de *Lactococcus lactis*
- una región (letra negrita) que posee los nucleótidos necesarios para generar proteína libre de etiqueta que contiene una extensión de aminoácido N-terminal corta para favorecer la purificación
- una región (letra subrayada) que posee el sitio de restricción *HindIII*

pPAL7-kivDII R (SEC ID nº 4):

gGAATTCTTAGCTTTTATTCTGTTCTGGCGAACAG

con

- una región (letra cursiva) homóloga a la secuencia del gen sintético del gen *kivD* de *Lactococcus lactis*,
- una región (letra subrayado) que posee el sitio de restricción *EcoRI*

El plásmido pPAL7-kivDII se introdujo entonces en las células BL21 (DE3) competentes (Invitrogen).

3.2 - Sobreproducción de la proteína KivD

La sobreproducción de la proteína KivD se realizó aplicando el mismo protocolo como el ejemplo nº 2.2.

3.3 - Purificación de la proteína KivD

3.3.1 - Etapa 1: Preparación de extractos libres de células.

Se suspendieron alrededor de 188 mg de biomasa de *E. coli* en 30 ml de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6, y un cóctel de inhibidores de proteasas. La suspensión celular (15 ml por tubo cónico) se sometió a ultrasonidos en hielo (Bandelin sonoplus, 70 W) en un tubo cónico de 50 ml durante 8 ciclos de 30 s, con intervalos de 30 s. Después del tratamiento con ultrasonidos, las células se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente con MgCl₂ 5 mM y 1 UI/ml de DNaseI. El desecho celular se eliminó mediante centrifugación a 12000 g durante 30 min. a 4°C.

3.3.2 - Etapa 2: Purificación por afinidad

La proteína se purificó a partir del extracto celular bruto mediante afinidad en una columna Profinity (BIORAD, cartucho Bio-Scale Mini Profinity exact, 5 ml) según el protocolo recomendado por el fabricante. El extracto bruto se cargó en un cartucho de 5 ml Profinity exact equilibrado con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna del mismo tampón y se incubó toda la noche con fosfato de potasio 100 mM pH 7,6,

fluoruro 100 mM a 4°C. La proteína se eluyó de la columna con 2 volúmenes de columna de fosfato de potasio 100 mM pH 7,6. La etiqueta permaneció fuertemente unida a la resina y la proteína purificada se liberó. Las fracciones que contienen la proteína se reunieron y se dializaron frente a fosfato de potasio 100 mM, NaCl 150 mM y glicerol al 10% pH 8.

La concentración de proteína se midió usando el ensayo de proteína de Bradford.

3.4 - Ensayo de 4-hidroxi-2-cetobutirato descarboxilasa

3.4.1 - Síntesis química de ácido 4-hidroxi-2-cetobutírico

La síntesis química del ácido 4-hidroxi-2-cetobutírico se ha descrito en la publicación: R S Lane; EE Dekker; (1969). 2-keto-4-hydroxybutyrate. Synthesis, chemical properties, and as a substrate for lactate dehydrogenase of rabbit muscle Biochemistry., 8 (7), 2958-2966.

3.4.2 - Ensayo de 4-hidroxi-2-cetobutirato descarboxilasa

La descarboxilación de 4-hidroxi-2-cetobutirato se midió a 30°C usando un ensayo enzimático acoplado. El ensayo de la actividad de 4-hidroxi-2-cetobutirato descarboxilasa se llevó a cabo con tampón de fosfato potásico 50 mM pH 6, NADH 0,2 mM, MgSO₄ 1 mM, difosfato de tiamina 0,5 mM, alcohol deshidrogenasa 72 unidades/ml procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, ácido 4-hidroxi-2-cetobutírico 10 mM neutralizado, y alrededor de 40 µg de proteína purificada en un volumen total de 1 ml. El consumo de NADH se monitorizó a 340 nm en un espectrofotómetro. La actividad detectada en el ensayo de control, que carece del sustrato, se restó de la actividad detectada en el ensayo con sustrato. Una unidad de actividad de 4-hidroxi-2-cetobutirato descarboxilasa es la cantidad de enzima requerida para catalizar la descarboxilación de 1 µmol de ácido 4-hidroxi-2-cetobutírico por min. a 30°C. (Épsilon 340 nm = 6290 M⁻¹ cm⁻¹).

3.5 - Actividad de la enzima purificada

	Actividad de enzima purificada (mUI/mg)
Ensayo de 4-hidroxi-2-cetobutirato descarboxilasa	147

Ejemplo 4

Demostración de la actividad de 3-hidroxi-2-oxopropionaldehído reductasa codificada por el gen *yqhD* de *Escherichia coli*

4.1 - Construcción de una cepa para la caracterización de YqhD: MG1655 ΔyqhD::Km (pTRC99A-yqhD)

4.1.1 - Construcción de la cepa MG1655 ΔyqhD::Km

Para suprimir el gen *yqhD*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o a kanamicina, a la vez que suprime la mayoría de los genes implicados. Para este fin, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

ΔyqhDF (SEC ID nº 5)

atgaacaactttaatctgcacaccccaaccgcattctgtttggttaaaggcgcaatcgctggtttacgcgaacaaattccgtgtaggc
tggagctgcttcg

con

- una región (minúsculas) homóloga a la secuencia (3153377 a 3153456) de la región *yqhD* (secuencia de referencia del sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. y Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

ΔyqhDR (SEC ID nº 6)

ttagcggggcggcttcgtatatacggcggctgacatccaacgtaattgtcatgattttcgcccagttgggtcatgccgtgctccatga
atatcctccttag

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (3154540 a 3154460) de la región *yqhD* (secuencia de referencia del sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. y Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos $\Delta yqhDF$ y $\Delta yqhDR$ se usan para amplificar el casete de resistencia a kanamicina procedente del plásmido pKD4. El producto de la PCR obtenido se introduce entonces mediante electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). Entonces se seleccionan los transformantes resistentes a kanamicina, y la inserción del casete de resistencia se verifica mediante un análisis de PCR con los oligonucleótidos *yqhDF* e *yqhDR* definidos más abajo. La cepa retenida se denomina MG1655 $\Delta yqhD::Km$.

yqhDF (SEC ID nº 7): ggcgtctcgccatacaacaacgcacatcgggc (homóloga a la secuencia de 3153068 a 3153100).

yqhDR (SEC ID nº 8): gggcttgccgacaccttctgtctgtg (homóloga a la secuencia de 3154825 a 3154797).

4.1.2 - Construcción del plásmido pTRC99A-*yqhD*

Para caracterizar la proteína *YqhD*, se expresó el gen correspondiente a partir del vector pTRC99A (Amersham).

Para este fin, el gen *yqhD* se amplificó a partir del genoma de *E. coli* usando los oligonucleótidos *yqhD* F pTRC99A F e *yqhD* R pTRC99A R. El producto de la PCR se restringió usando las enzimas *HindIII* y *BspHI*, y se clonó en el vector pTRC99A, restringido por las enzimas de restricción *NcoI*-*HindIII*. El vector resultante se denominó pTRC99A-*yqhD*.

yqhD F pTRC99A F (SEC ID nº 9):

cgatgcacg**tc**atgaacaactttaatctgcacacccaacccg,

con

- una región (letra subrayada) homóloga a la secuencia (3153377 a 3153408) del gen *yqhD* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- un sitio de restricción *BspHI* (letra negrita)

yqhD R pTRC99A R (SEC ID nº 10):

ggcgtaaa**aa**gcttagcgggcgcttcgatatacggctgacatccaacgaatgtcgatttcg

con

- una región (letra subrayada) homóloga a la secuencia (3154540 a 3154483) del gen *yqhD* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- un sitio de restricción *HindIII* (letra negrita)

El plásmido pTRC99A-*yqhD* se introdujo entonces en la cepa MG1655 $\Delta yqhD::Km$.

4.2 - Sobreproducción de la proteína *YqhD*

La proteína *YqhD* se sobreprodujo a 37°C en condiciones aerobias en matraces Erlenmeyer de 2 l con placas deflectoras con 500 ml de medio LB con glucosa 2,5 g/l y 50 mg/l de ampicilina y 50 mg/ml de kanamicina. Los matraces se agitaron a 200 rpm en un agitador orbital. cuando la densidad óptica medida a 550 nm alcanzó 0,5 unidades, los matraces se incubaron a 25°C. Cuando la densidad óptica alcanzó 1,2 unidades, se indujo la producción de proteína *YqhD* al añadir IPTG hasta una concentración final de 500 μM . La biomasa se cosechó mediante centrifugación cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica por encima de 3,5 unidades. El sobrenadante se descartó y el pelete se almacenó a -20°C antes del uso.

4.3 - Purificación de la proteína *YqhD*

4.3.1 - Etapa 1: Preparación de extractos libres de células.

Se suspendieron 400 mg de biomasa de *E. coli* en 70 ml de Hepes 50 mM pH 7,5, y un cóctel de inhibidores de proteasas. Las células se sometieron a ultrasonidos en hielo (aparato de ultrasonidos Branson, 70W) en una celda

Rosett RZ3 durante ocho ciclos de 30 s, con intervalos de 30 s. Después del tratamiento con ultrasonidos, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con MgCl_2 1 mM y 1 UI/ml de DNaseI. El desecho celular se eliminó mediante centrifugación a 12000 g durante 30 min. a 4°C. El sobrenadante se mantuvo como el extracto bruto.

4.3.2 - Etapa 2: Precipitación con sulfato de amonio

El extracto bruto se precipitó a una concentración de sulfato de amonio al 50%: se añadió sulfato de amonio sólido (300 g/l) al extracto bruto en hielo. Después de 15 min. de incubación a 4°C, la mezcla se centrifugó a 12000 g durante 15 min. a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se disolvió en 50 ml de Hepes 50 mM pH 7,5, sulfato de amonio 1 M.

4.3.3 - Etapa 3: Cromatografía hidrófoba.

Usando un Akta Purifier (GE Healthcare), el extracto proteico procedente de la etapa previa se cargó sobre una columna de 5 ml HiTrap PhenylHP (GE Healthcare) equilibrada con el mismo tampón. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna del mismo tampón. Las proteínas se eluyeron con dos gradientes por etapas, un gradiente de 10 volúmenes de columna de sulfato de amonio desde 1 M hasta 0,5 M, y un gradiente de 20 volúmenes de columna de sulfato de amonio desde 0,5 M hasta 0 M. Tras la elución, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de Hepes 50 mM pH 7,5. El caudal de la columna fue 2,5 ml/min., y se recogieron fracciones de 2,5 ml. Las fracciones que contienen la proteína se reunieron, se dializaron en Hepes 50 mM pH 7,5 y se concentraron hasta una concentración de 1,14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.4 - Ensayo de actividad de 3-hidroxipropionaldehído reductasa

La actividad de 3-hidroxipropionaldehído reductasa se evaluó midiendo la velocidad inicial de oxidación de NADPH con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm y a una temperatura constante de 37°C. La mezcla de reacción que usa 3-hidroxipropionaldehído como sustrato se llevó a cabo en Hepes 20 mM pH 7,5, sulfato de cinc 0,1 mM, NADPH 0,2 mM, 6 μg de enzima purificada, en un volumen final de 1 ml. La mezcla de reacción se incubó durante 5 min. a 37°C antes de que se iniciase la reacción mediante la adición del sustrato 3-hidroxipropionaldehído a una concentración final de 10 mM. El blanco de la reacción contenía todos los componentes de la mezcla de reacción excepto la enzima purificada. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que consumió 1 μmol de sustrato por minuto a 37°C. La actividad enzimática específica se expresó como unidades por mg de proteína.

4.5 - Actividad de la enzima purificada

	Actividad de enzima purificada (mUI/mg)
Ensayo de actividad de 3-hidroxipropionaldehído reductasa	735 \pm 74

Ejemplo 5

Construcción de cepas con un mayor flujo de la ruta de 1,3-propanodiol y que expresan un gen que codifica 4-hidroxi-2-cetobutirato descarboxilasa, un gen que codifica 3-hidroxipropionaldehído reductasa y un gen que codifica L-homoserina transaminasa: MG1655 ΔpykF ΔmetA $\Delta\text{thrLABC}$ (pBBR1MCS5-P_{trc}01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07) (pME101-thrA*1-serC)

5.1 Construcción de la cepa MG1655 ΔpykF

Para suprimir el gen *pykF*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000, PNAS, 97: 6640-6645). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o a kanamicina, a la vez que suprime la mayoría de los genes implicados. Para este fin, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

ΔpykFF (SEC ID nº 11)

cccatccttctcaacttaagactaagactgtcatgaaaaagaccaaattgtttgcaccatcggaccgaaaaccgaaTG TAG
GCTGGAGCTGCTTCG

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (1753689-1753766) de la región *pykF* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),

- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina,

Δ pykFR (SEC ID nº 12)

**ggacgtgaacagatgcggtgttagtagtgccgctcggtaccagtgccaccagaaaccataactacaacgtcacctttgtgCATA
TGAATATCCTCCTTAG**

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (1755129-1755051) de la región *pykF* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina.

Los oligonucleótidos Δ pykFF y Δ pykFR se usaron para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto de la PCR obtenido se introdujo entonces mediante electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). Entonces se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina, y la inserción del casete de resistencia se verificó mediante un análisis de PCR con los oligonucleótidos pykFF y pykFR definidos a continuación. La cepa retenida se denominó MG1655 Δ pykF::Km.

pykFF (SEC ID nº 13): gcgtaacctttccctggaacg (homóloga a la secuencia de 1753371 a 1753392).
pykFR (SEC ID nº 14): gcgttgctggagcaacctgccagc (homóloga a la secuencia de 1755518 a 1755495).

Se eliminó el casete de resistencia a kanamicina. El plásmido pCP20 que posee FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a kanamicina se introdujo entonces en los sitios recombinantes mediante electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, se verificó la pérdida de los casetes de resistencia a kanamicina mediante un análisis de PCR con los mismos oligonucleótidos como se usaron previamente (pykFF/pykFR). La cepa retenida se denominó MG1655 Δ pykF.

5.2 - Construcción de la cepa MG1655 Δ pykF Δ metA

Para suprimir el gen *metA*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o a kanamicina, a la vez que suprime la mayoría de los genes implicados. Para este fin, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Δ metAF (SEC ID nº 15):

**tfcgtgtgccggacgagctacccgccgcaatttcttgcgtgaagaaaacgtctttgtgatgacaacttctcgtgcgtctGTAG
GCTGGAGCTGCTTCG**

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (4212310-4212389) de la región *metA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. y Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Δ metAR (SEC ID nº 16):

**atccagcgttgattcatgtgccgtagatcgtatggcgtgatctggttagacgtaatagttgagccagttggttaaacagtaCATAT
GAATATCCTCCTTAG**

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (4213229-4213150) de la región *metA* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. y Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

Los oligonucleótidos Δ metAF y Δ metAR se usaron para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto de la PCR obtenido se introdujo entonces mediante electroporación en la cepa MG1655

(pKD46). Entonces se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina, y la inserción del casete de resistencia se verificó mediante un análisis de PCR con los oligonucleótidos metAF y metAR definidos a continuación. La cepa retenida se denominó MG1655 $\Delta metA::Km$.

- 5 metAF (SEC ID nº 17): tcaccttcaacatgcaggctcgacattggc (homóloga a la secuencia de 4212203 a 4212232).
metAR (SEC ID nº 18): ataaaaaaggcaccggaaggctgctgaggt (homóloga a la secuencia de 4213301 a 4213272).

Para transferir la $\Delta metA::Km$, se usó el procedimiento de transducción con el fago P1. La preparación del lisado fágico de la cepa MG1655 $\Delta metA::Km$ se usó para la transducción en la cepa MG1655 $\Delta pykF$.

Entonces se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina, y la $\Delta metA::Km$ se verificó mediante un análisis de PCR con los oligonucleótidos previamente definidos metF/metAR. La cepa retenida se denominó MG1655 $\Delta pykF \Delta metA::Km$.

Se eliminó el casete de resistencia a kanamicina. El plásmido pCP20 que posee FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT del casete de resistencia a kanamicina se introdujo entonces en los sitios recombinantes mediante electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, se verificó la pérdida del casete de resistencia a kanamicina mediante un análisis de PCR con los mismos oligonucleótidos como se usaron previamente (pykFF/pykFR, y metF/metAR). La cepa retenida se denominó MG1655 $\Delta pykF \Delta metA$.

5.3 - Construcción de la cepa MG1655 $\Delta pykF \Delta metA \Delta thrLABC$

Para suprimir el operón thrLABC, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o a kanamicina, mientras que suprime la mayoría de los genes implicados. Para este fin, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

DthrLABF (SEC ID nº 19):

**cgggcaatatgtctctgtgtggattaaaaaagagtgctgatagcagcttctgaactggttaccttcttggctcaccttcgggtggg
cctttctggtatacTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG**

con

- una región (letra minúscula) homóloga a la secuencia (22-86) de la región *thrLABC* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra minúscula subrayada en negrita) para la secuencia del terminador transcripcional T7Te del fago T7 (Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 24 de abril de 2001; 98(9):5019-24.),
- una región (letra mayúscula) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. y Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

DthrLABCR (SEC ID nº 20):

**CCCTGTCATTTTTCTCCATAATTTCTTCATAAAAAAGCCGGGCTGCATAAAAGC
AAACCCGGCCTGATTGAGATAATGAATAGATTCCCGGGGGAGGCGCCCGCGG
ATCCCATATGAATATCCTCCTTAG**

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (5106-5021) de la región *thrLABC* (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula cursiva) para la adición de un sitio de restricción *Bam*HI - *Sfo*I - *Sma*I
- una región (letra mayúscula en negrita) para la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol.

Los oligonucleótidos DthrBF y DthrCR se usaron para amplificar el casete de resistencia a cloranfenicol a partir del plásmido pKD3. El producto de la PCR obtenido se introdujo entonces mediante electroporación en la cepa MG1655 (pKD46). Entonces se seleccionaron los transformantes resistentes a cloranfenicol, y la inserción del casete de resistencia se verificó mediante un análisis de PCR con los oligonucleótidos thrLF y thrCR definidos a continuación. La cepa retenida se denominó MG1655 $\Delta thrLABC::Cm$.

thrLF (SEC ID nº 21): GCCATGCCGCGCTGGTGTGGTCGCG (homóloga a la secuencia de 4639281 a 4639307).

5 thrCR (SEC ID nº 22): GCGACCAGAACCCAGGGAAAGTGCG (homóloga a la secuencia de 5283 a 5260).

Para transferir la $\Delta thrLABC::Cm$, se usó el procedimiento de transducción con el fago P1. La preparación del lisado fágico de la cepa MG1655 $\Delta thrLABC::Cm$ se usó para la transducción en la cepa MG1655 $\Delta pykF \Delta metA$. Entonces se seleccionaron los transformantes resistentes a cloranfenicol, y la $\Delta thrLABC::Cm$ se verificó mediante un análisis de PCR con los oligonucleótidos previamente definidos thrLF y thrCR. La cepa retenida se denominó MG1655 $\Delta pykF \Delta metA \Delta thrLABC::Cm$.

Se eliminó el casete de resistencia a cloranfenicol. El plásmido pCP20 que posee FLP recombinasa que actúa en los sitios FRT de los casetes de resistencia a cloranfenicol se introdujo entonces en los sitios recombinantes mediante electroporación. Después de una serie de cultivos a 42°C, se verificó la pérdida del casete de resistencia a cloranfenicol mediante un análisis de PCR con los mismos oligonucleótidos como se usaron previamente (pykFF/pykFR, metF/metAR y thrLF/thrCR). La cepa retenida se denominó MG1655 $\Delta pykF \Delta metA \Delta thrLABC$.

5.4 - Construcción de un plásmido para la sobreexpresión del gen serC de L-homoserina transaminasa de *Escherichia coli*: plásmido pME101-thrA*1-serC

Para incrementar la expresión del gen serC, el gen se expresó a partir del pME101-thrA*1 previamente descrito (documento PCT_WO2008707041) usando su promotor apropiado.

25 Para este fin, el gen serC se amplificó a partir del genoma de *E. coli* usando los oligonucleótidos serC F y serC R. El producto de la PCR se restringió usando las enzimas XbaI y SmaI, y se clonó en el vector pME101-thrA*1, restringido mediante las mismas enzimas de restricción. El vector resultante se denominó pME101-thrA*1-serC.

serC F (SEC ID nº 23):

TGCTCTAGAGTCCGCGCTGTGCAAATCCAGAATGG

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (956619 - 956644) del gen serC (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula en negrita) que posee el sitio XbaI

serC R (SEC ID nº 24):

CCCAAGCTTAAGTCTCTACAACAGAAATAAAAAAC

con

- una región (letra mayúscula) homóloga a la secuencia (958028 - 958004) de la región serC del gen (secuencia de referencia en el sitio web <http://www.ecogene.org/>),
- una región (letra mayúscula en negrita) que posee el sitio HindIII.

El fragmento amplificado mediante PCR se cortó con las enzimas de restricción XbaI e HindIII, y se clonó en los sitios XbaI-HindIII del vector pME101-thrA*1 dando el vector pME101-thrA*1-serC.

5.5 - Construcción de un plásmido para la sobreexpresión del gen yqhD de 3-hidroxi-2-cetobutirato reductasa de *Escherichia coli* y del gen kivD de 4-hidroxi-2-cetobutirato descarboxilasa de *Lactococcus lactis*: plásmido pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07

Primero se construyó el plásmido pME101-yqhD-kivDII-TT07. El gen kivDII procedente del vector pME101-kivDII-TT07 (documento PCT/2009/067994) restringido mediante BsrBI y BglII se clonó en el vector pME101VB01-yqhD (previamente descrito en el documento PCT/2007/000509) restringido por SnaBI y BglII, y el plásmido resultante se denominó pME101-yqhD-kivDII-TT07.

Los genes yqhD y kivDII se amplificaron entonces mediante PCR a partir del plásmido pME101-yqhD-kivDII-TT07 con los oligonucleótidos Ptrc01-RBS01-yqhD pBBR F y kivD pBBR R. El producto de la PCR se digirió con las enzimas de restricción SpeI y SmaI, y se clonó en el vector pBBR1MCS5 (M. E. Kovach, (1995), Gene 166:175-176),

restringido por las mismas enzimas, dando el vector pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-*yqhD-kivDII*-TT07.

Ptrc01-RBS01-*yqhD* pBBR F (SEC ID nº 25)

Aga**ACTAGTgagctgttgacaattaatcatccggctcgataatgtgtggaagtcgac****GGATCCtaaggaggttat**
aaatgaacaactttaatctgcacacccc

- una región (letra mayúscula en negrita) para la adición de un sitio de restricción *SpeI*
- una región (letra minúscula en negrita) para la adición de la secuencia del promotor *Ptrc* constitutivo
- una región (letra mayúscula en cursiva) para la adición de un sitio de restricción *Bam*HI
- una región (letra minúscula subrayada) para la adición de la secuencia del sitio de unión al ribosoma
- una región (letra minúscula en cursiva) homóloga a la secuencia (3153377-3153402) del gen *yqhD* de MG1655 (<http://www.ecogene.org/>)

kivD pBBR R (SEC ID nº 26)

GAGCCCCGGGGCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAGTGTGATACGTAGAA
TTCTTAATTAAGTTAGCTTTTATTCTGTTCTGGCG

- una región (letra mayúscula en cursiva en negrita) para la adición de un sitio de restricción *SmaI*
- una región (letra mayúscula subrayada) para la secuencia del terminador transcripcional T7Te del fago T7 (Harrington K.J., Laughlin R.B. y Liang S. Proc Natl Acad Sci USA. 24 de abril de 2001; 98(9):5019-24.),
- una región (letra mayúscula en negrita) para la adición de sitios de restricción *Sna*BI - *Eco*RI - *Pac*I
- una región (letra mayúscula en cursiva) homóloga al extremo del gen *kivD* sintético

XX Construcción de la cepa MG1655 Δ pykF Δ metA Δ thrLABC (pME101-*thrA**1-*serC*) (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-*yqhD-kivDII*-TT07).

Los plásmidos pME101-*thrA**1-*serC* y pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-*yqhD-kivDII*-TT07 se introdujeron entonces en la cepa MG1655 Δ metA Δ pykF Δ thrLABC.

Ejemplo 6

Construcción de una cepa con mayor flujo de la ruta de 1,3-propanodiol en sacarosa que expresa un gen que codifica 4-hidroxi-2-cetobutirato carboxilasa y un gen que codifica 3-hidroxipropionaldehído reductasa, y un sistema de transporte no PTS de sacarosa: MG1655 Δ pykF Δ metA Δ thrLABC (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-*yqhD-kivDII*-TT07) (pME101-*thrA**1-*serC*) (pKJL101-1)

El plásmido pKJL101-1 se describió en otra parte (Jahreis, K. *et al.* 2002. Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild-type strain EC3132. J. Bact. P5307-5316). Los plásmidos pME101-*thrA**1-*serC*, pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-*yqhD-kivDII*-TT07 y pKJL101-1 se introdujeron en la cepa MG1655 Δ metA Δ pykF Δ thrLABC.

Ejemplo 7

Cultivo para la producción de 1,3-propanodiol

Los comportamientos de las cepas se evaluaron en cultivos en matraces Erlenmeyer con placas deflectoras de 500 ml usando medio M9 modificado (Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128) que se suplementó con treonina 4,5 mM, metionina 5 mM, MOPS 10 g/l y sacarosa o glucosa 10 g/l y se ajustó a pH 6,8. Se añadieron espectinomycin y/o gentamicina si fue necesario, a una concentración de 50 mg/l, y/o se añadió cloranfenicol si fue necesario, a una concentración de 60 mg/l. También se añadió IPTG 100 μ M para la inducción del vector de expresión pME101, si está presente. Se usó un precultivo, cultivado durante 24 h, para inocular un cultivo de 50 ml hasta una OD_{600nm} de alrededor de 0,1. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C y 200 rpm hasta que se agotó la sacarosa en el medio de cultivo. En este punto, los azúcares que quedan y los productos principales se analizaron mediante HPLC usando una columna Biorad HPX 97H para la separación, y un refractómetro para la detección. La producción de 1,3-propanodiol se determinó mediante LC/MS/MS.

Los comportamientos de diferentes cepas se dan en la tabla a continuación.

Ref del cultivo	Ref de la cepa	Genotipo	Fuente de carbono	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)	[1,3-PDO] (mM)
FbDI421	DI0084c02	MG1655 DpykF DmetA DthrLABC	Glucosa	0,264	nd
FbDI395	DI0107c01	MG1655 DpykF DmetA DthrLABC (pME101-thrA*1-serC) (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07)	Glucosa	0,171	0,30
	DI0107c01	MG1655 DpykF DmetA DthrLABC (pME101- thrA*1-serC) (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2- yqhD-kivDII-TT07)	Sacarosa	-*	-*
FbDI419	DI0129c01	MG1655 DpykF DmetA DthrLABC (pME101-thrA*1-serC) (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07) (pKJL101.1)	Sacarosa	0,131	0,11

Producción de PDO de diversas cepas que expresan hidroxil cetooácido descarboxilasa y 3-hidroxipropionaldehído reductasa cultivadas con glucosa o sacarosa como fuente de carbono; nd: no detectado; * MG1655 de *E. coli* de tipo salvaje no crece sobre una fuente de carbono de sacarosa sola.

Como se puede observar en la tabla anterior, las cepas que expresan la hidroxil cetooácido descarboxilasa y 3-hidroxipropionaldehído reductasa producen PDO a partir de sacarosa si el flujo para la producción de L-homoserina se incrementa mediante la supresión de *pykF* y la sobreexpresión de *thrA*1*, la transformación de L-homoserina se reduce suprimiendo *metA* y *thrABC*, y la transformación de L-homoserina en 4-hidroxil-2-cetobutirato es catalizada por la sobreexpresión de *serC*. Según nuestro conocimiento, no se ha demostrado producción de PDO en *E. coli* de tipo salvaje en ninguna fuente de carbono, demostrando que las modificaciones anteriores convierten a una cepa de tipo salvaje de *E. coli* no productora de PDO en una cepa productora de PDO.

Ejemplo 8

Construcción de la cepa: MG1655 $\Delta pykF \Delta metA \Delta thrLABC \Delta RN/yfdC-dsdX::cscB^*(Q353H)KAR^* \Delta cscR::Km$ (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07) (pME101-thrA*1-serC)

Como se puede observar en el ejemplo 7, la cepa de producción de PDO en sacarosa (que integra el sistema de transporte de sacarosa con pKJL101.1) parece producir menos PDO que la cepa de referencia. Se cree que esto demuestra un problema de estabilidad debido a los tres vectores diferentes contenidos en la cepa. De este modo, se decidió introducir el sistema de transporte de sacarosa en el cromosoma, a fin de obtener una cepa más estable.

8.1 Construcción de la cepa MG1655 $\Delta RN/yfdC-dsdX::cscB^*(Q353M)KAR^*::Cm$

Para construir una cepa capaz de crecer en sacarosa como la única fuente de carbono, se transdujeron los genes *csc* en la cepa MG1655 con un lisado del fago P1 procedente de la cepa LJM115 (Jahreis K., Bentler L., Bockmann J., Hans S., Meyer A., Siepelmeyer J., Lengeler J.W. J. Bact. 2002. 184(19):5307-5316).

Se seleccionaron los recombinantes resistentes a cloranfenicol, y la presencia de los genes *csc* se verificó mediante PCR con los cebadores Opg 0590_ yfdC seq (SEC ID nº 27) y Opg 1242_ dsdX-dsdA seq (SEC ID nº 28). La cepa verificada y seleccionada se denominó MG1655 $\Delta RN/yfdC-dsdX::cscB^*(Q353H)KAR^*::Cm$.

Opg 0590_ yfdC seq (SEC ID nº 27): GTGCGGCAAAGATTGTGGTG (homóloga a la secuencia de 2463948 a 2463967)

Opg 1242_ dsdX-dsdA seq (SEC ID nº 28): GCCAGTTTTCTGCGTGTGCC (homóloga a la secuencia de 2477624 a 2477604)

8.2 Construcción de la cepa MG1655 $\Delta pykF \Delta metA \Delta thrLABC \Delta RN/yfdC-dsdX::cscB^*(Q353H)KAR^* \Delta cscR::Km$

Para suprimir el gen *cscR*, se usó la estrategia de recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000). Esta estrategia permite la inserción de un casete de resistencia a cloranfenicol o a kanamicina, a la vez que suprime la mayoría de los genes implicados. Para este fin, se usaron los siguientes oligonucleótidos.

Odi 0195_cscR::Cm F (SEC ID nº 29)

GGTGGAAACAACGGATCAACAGCGGGCAAGGGATCCGCGTCACTCTTCCCC
CTTCACGACCTTCAATAATATGCAATGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

- una región (letra mayúscula en negrita) homóloga al extremo del gen *cscR*,
- una región (letra mayúscula subrayada) para la amplificación del gen de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. y Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Odi 0196_*cscR*::Cm R (SEC ID nº 30)

ATGGCTTCATTAAAGGATGTGCGACGCCTGGCGGGAGTGTGCGATGATGAC
AGTCTCCCGGGTGTATGCATAATGCAGAATCCATATGAATATCCTCCTTAG

- una región (letra mayúscula en negrita) homóloga al comienzo del gen *cscR*,
- una región (letra mayúscula subrayada) para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina (secuencia de referencia en Datsenko, K.A. y Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

Los oligonucleótidos Odi 0195_*cscR*::Cm F y Odi 0196_*cscR*::Cm R se usaron para amplificar el casete de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. El producto de la PCR obtenido se introdujo entonces mediante electroporación en la cepa MG1655 Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR*::Cm. Entonces se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina, y la inserción del casete de resistencia se verificó mediante un análisis de PCR con los oligonucleótidos Opg 1242_*dsdX-dsdA* seq descrito anteriormente (SEC ID nº 28) y Opg 0511_*csc8* (SEC ID nº 31) definido más abajo. La cepa retenida se denominó MG1655 Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR* Δ *cscR*::Km.

Opg 0511_*csc8* (SEC ID nº 31): CGATACATCATCCGTGGAAG (homóloga a la secuencia del gen *cscA*)

Para transferir la modificación cromosómica Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR* Δ *cscR*::Km, se usó el procedimiento de transducción con el fago P1. La preparación del lisado fágico de la cepa MG1655 Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR* Δ *cscR*::Km se usó para la transducción en la cepa MG1655 Δ *pykF* Δ *metA* Δ *thrLABC* descrita en 5.3.

Entonces se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina, y la Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR* Δ *cscR*::Km se verificó mediante un análisis de PCR con los oligonucleótidos previamente definidos Opg 1242_*dsdX-dsdA* seq/Opg 0511_*csc8*. La cepa retenida se denominó MG1655 Δ *pykF* Δ *metA* Δ *thrLABC* Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR* Δ *cscR*::Km.

8.3 Construcción de la cepa MG1655 Δ *pykF* Δ *metA* Δ *thrLABC* Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR* Δ *cscR*::Km (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07) (pME101-*thrA**1-serC)

Los plásmidos pME101-*thrA**1-serC y pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07 (descritos en 5.4 y 5.5) se introdujeron finalmente en la cepa MG1655 Δ *metA* Δ *pykF* Δ *thrLABC* Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR* Δ *cscR*::Km. La cepa resultante se denominó MG1655 Δ *pykF* Δ *metA* Δ *thrLABC* Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR* Δ *cscR*::Km (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07) (pME101-*thrA**1-serC).

Ejemplo 9

Cultivo de nueva cepa de producción en sacarosa

Cepa 1: MG1655 Δ *pykF* Δ *metA* Δ *thrLABC* (pME101-*thrA**1-serC) (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07) descrita en el ejemplo 5.5;

Cepa 2: MG1655 Δ *pykF* Δ *metA* Δ *thrLABC* Δ RN/*yfdC-dsdX::cscB**(Q353H)KAR* Δ *cscR*::Km (pBBR1MCS5-Ptrc01/RBS01*2-yqhD-kivDII-TT07) (pME101-*thrA**1-serC) descrita en el ejemplo 8.3.

Las cepas de producción se evaluaron en matraces Erlenmeyer pequeños usando medio M9 modificado (Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128) que se suplementó con treonina 4,5 mM, metionina 5 mM y MPOS 10 g·l⁻¹ y se ajustó a pH 6,8. Se añadió glucosa a una concentración de 10 g·l⁻¹ para la cepa 1, y para la cepa 2 se añadió sacarosa a una concentración de 10 g·l⁻¹.

Se hizo crecer un precultivo de 5 ml a 37°C durante 6,5 horas en un medio mixto (medio LB al 10% (Sigma 25%) con glucosa o sacarosa 2,5 g·l⁻¹, y medio mínimo al 90% descrito anteriormente). Se usó para inocular un cultivo de 50 ml hasta una OD₆₀₀ de 0,1 en medio mínimo. También se añadió IPTG (100 μ M) para la inducción del vector de expresión pME101. Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a concentraciones de 50 mg·l⁻¹ para kanamicina y espectinomicina, y 10 mg·l⁻¹ para gentamicina. La temperatura de los cultivos fue 37°C. Cuando el cultivo hubo alcanzado una OD₆₀₀ de 7 a 9, los metabolitos extracelulares se analizaron usando HPLC con detección

refractométrica (ácidos orgánicos y sacarosa). La producción de 1,3-propanodiol se determinó mediante LC/MS/MS. Se realizaron cuatro repeticiones para la cepa 2.

5 Tabla 2: Producción de PDO en cultivo por lotes mediante las cepas 1 y 2. SD representa la desviación estándar para la concentración, que se calculó en base a las repeticiones. El número de repeticiones se indica entre paréntesis.

Cepa	Fuente de carbono	PDO (Mm)	SD	Velocidad de crecimiento (h^{-1})
Cepa 1 (N = 14)	Glucosa	0,08	0,03	$0,29 \pm 0,02$
Cepa 2 (N = 4)	Sacarosa	0,12	0,02	$0,32 \pm 0,03$

10 Como se puede observar en la tabla anterior, la producción de PDO a partir de sacarosa como fuente de carbono está en el mismo intervalo que a partir de glucosa como fuente de carbono.

Referencias (en el orden que se cita en el texto)

- 15 Schmid K, Schupfner M, Schmitt R (1982), J. Bacteriol. 151: 68-76
- Schmid K, Ebner R, Altenbuchner J, Sxhmitt R, Lengeler JW (1988), Mol. Microbiol. 2: 1-8
- Bockmann J, Heuel H, Lengeler JW (1992), Mol. Gen. Genet. 235: 22-32
- 20 Jahreis K, Bentler L, Bockmann J, Hans S, Meyer A, Siepelmeyer J, Lengeler JW (2002), J. Bacteriol. 184: 5307-5316
- Tsunekawa H, Azuma S, Okabe M, Okamoto R, Aiba S (1992), Appl. Environ. Microbiol. 58 2081-2088
- 25 Penfold DW y Macaskie LE (2004), Biotechnol. Lett. 26: 1879-1883
- Anderson (1946) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128

Listado de secuencias

- 30 <110> METABOLIC EXPLORER SOUCAILLE, PHILIPPE BOISART, CEDRIC
- <120> Procedimiento para la preparación de 1,3-propanodiol a partir de sacarosa
- 35 <130> 358570 D28689
- <150> EP10305729.5
- <151> 2010-07-05
- 40 <150> US61/361,455
- <151> 2010-07-05
- <160>31
- 45 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 40
- <212> ADN
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido
- 55 <400> 1
- cccaagcttt gatggctcaa atcttcaatt ttagttctgg 40
- <210>2
- 60 <211> 35
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 2		
5	ggaattctta accgtgacgg cgttcgaact caacc	35	
	<210>3		
	<211> 39		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
15	<400> 3		
	cccaagcttt gacttctatg tataccgtgg gtgattatc	39	
20	<210>4		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 4		
30	ggaattctta gcttttattc tggtcggcga acag	34	
	<210>5		
	<211> 101		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
40	<400> 5		
	atgaacaact ttaatctgca caccccaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct	60	
	ggtttacgcg aacaaattcc gtgtaggctg gagctgcttc g	101	
	<210>6		
	<211> 101		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
50	<400> 6		
	ttagcgggcg gcttcgtata tacggcggct gacatccaac gtaatgtcat gattttcgcc	60	
	cagttgggtc atgccgtgct ccatatgaat atcctcctta g	101	
	<210>7		
	<211> 33		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		

	<223> Oligonucleótido	
	<400> 7	
5	ggcgtctcgc catacaacaa acgcacatcg ggc	33
	<210>8	
	<211> 29	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
15	<400> 8	
	gggcttgcc gacaccttct tcgttcttg	29
	<210>9	
20	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido	
	<400> 9	
	cgatgcacgt catgaacaac ttaatctgc acacccaac ccg 43	
30	<210> 10	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 10	
40	ggcgtaaaaa gcttagcggg cggcttcgta tatacggcgg ctgacatcca acgtaatgtc	60
	tgattttcg	70
	<210> 11	
45	<211> 98	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido	
	<400> 11	
	cccatccttc tcaacttaaa gactaagact gtcatgaaaa agaccaaaat tgtttgcacc	60
	atcggaccga aaaccgaatg taggctggag ctgcttcg	98
55	<210> 12	
	<211> 99	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 12	

ES 2 490 968 T3

	ggacgtgaac agatgcggtg ttagtagtgc cgctcggtac cagtgcacca gaaaccataa	60
	ctacaacgtc acctttgtgc atatgaatat cctccttag	99
5	<210> 13 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido <400> 13	
	gcgtaacctt ttccctggaa cg	22
15	<210> 14 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido <400> 14	
25	gcgttgctgg agcaacctgc cagc	24
30	<210> 15 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido	
35	<400> 15 ttcgtgtgcc ggacgagcta cccgccgtca atttcttgcg tgaagaaaac gtctttgtga	60
	tgacaacttc tcgtgcgtct tgtaggctgg agctgcttcg	100
40	<210> 16 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido	
45	<400> 16 atccagcgtt ggattcatgt gccgtagatc gtatggcgtg atctggtaga cgtaatagtt	60
	gagccagttg gtaaacagta catatgaata tcctccttag	100
50	<210> 17 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido	
55	<400> 17	

ES 2 490 968 T3

	tcaccttcaa catgcaggct cgacattggc	30
5	<210> 18 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 18	
15	ataaaaaagg caccgaagg tgcctgaggt	30
	<210> 19 <211> 122 <212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido	
25	<400> 19 cgggcaatat gtctctgtgt ggattaaaaa aagagtgtct gatagcagct tctgaactgg	60
	ttaccttcct ggctcacctt cgggtgggcc tttctggtat actgtaggct ggagctgctt	120
	cg	122
30	<210> 20 <211> 130 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 20 ccctgtcatt tttctccata atttcttcat aaaaaagccg ggctgcataa aagcaaacc	60
	ggcctgattg agataatgaa tagattcccg ggggaggcgc ccgcggatcc catatgaata	120
	tcttccttag	130
40	<210> 21 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 21	
50	gccatgccgc gctggtgtt ggtcgcg	27
	<210> 22 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220>	

	<223> Oligonucleótido	
	<400> 22	
5	gcgaccagaa ccagggaaag tgcg	24
	<210> 23	
	<211> 35	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
15	<400> 23	
	tgctctagag tccgcgctgt gcaaatccag aatgg	35
	<210> 24	
20	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido	
	<400> 24	
	cccaagctta actctctaca acagaaataa aaac	34
30	<210> 25	
	<211> 104	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 25	
	agaactagtg agctgttgac aattaatcat ccggctcgta taatgtgtgg aagtcgacgg	60
40	atcctaagga gggtataaat gaacaacttt aatctgcaca cccc	104
	<210> 26	
	<211> 86	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
50	<400> 26	
	gagcccgggg cagaaaggcc caccgaagg tgagccagtg tgatacgtag aattcttaat	60
	taagttagct tttattctgt tcggcg	86
	<210> 27	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
60		

ES 2 490 968 T3

	<400> 27	
	gtgcggcaaa gattgtggtg	20
5	<210> 28 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 28	
15	gccagtttt ctgcgtgtgc c	21
	<210> 29 <211> 100 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido	
25	<400> 29	
	ggtggaacaa cggatcaaca gcgggcaagg gatccgcgtc actcttcccc cttcacgacc	60
	ttcaataata tgcaatgcag tgtaggctgg agctgcttcg	100
	<210> 30 <211> 100 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
35	<400> 30	
	atggcttcat taaaggatgt cgcacgcctg gcgggagtgt cgatgatgac agtctcccgg	60
	gtgatgcata atgcagaatc catatgaata tcctccttag	100
	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido	
45	<400> 31	
	cgatacatca tccgtggaag	20
50		

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo genéticamente modificado para la bioproducción de 1,3-propanodiol a partir de sacarosa, en el que el microorganismo comprende:
 - una ruta metabólica de dos etapas para la producción de 1,3-propanodiol, que comprende una primera etapa de descarboxilación de 4-hidroxi-2-cetobutirato con una enzima que tiene una actividad de 2-cetoácido descarboxilasa codificada por un gen endógeno, cuya expresión está potenciada o por un gen heterólogo, y una segunda etapa de reducción del 3-hidroxi-2-cetobutirato obtenido con una enzima que tiene actividad de hidroxil aldehído reductasa, y
 - unos genes funcionales que codifican un sistema de utilización de sacarosa PTS y/o un sistema de utilización de sacarosa no PTS, que permiten al microorganismo utilizar sacarosa como la única fuente de carbono.
2. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se ha modificado con la introducción de los genes *scrKYABR* o *scrKYAB*.
3. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se ha modificado con la introducción de los genes *cscBKAR* o *cscBKA*.
4. Microorganismo según la reivindicación 1 a 3, en el que la producción de 4-hidroxi-2-cetobutirato a partir de sacarosa está mejorada en el microorganismo.
5. Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, seleccionado de entre el grupo que consiste en bacteria, levadura y hongo.
6. Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se selecciona de entre *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomyetaceae* y *Corynebacteriaceae*.
7. Procedimiento para la producción fermentativa de 1,3-propanodiol a partir de sacarosa, que comprende las etapas siguientes:
 - cultivar un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un medio de cultivo apropiado que comprende sacarosa, y
 - recuperar 1,3-propanodiol a partir del medio de cultivo.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que 1,3-propanodiol se purifica adicionalmente.

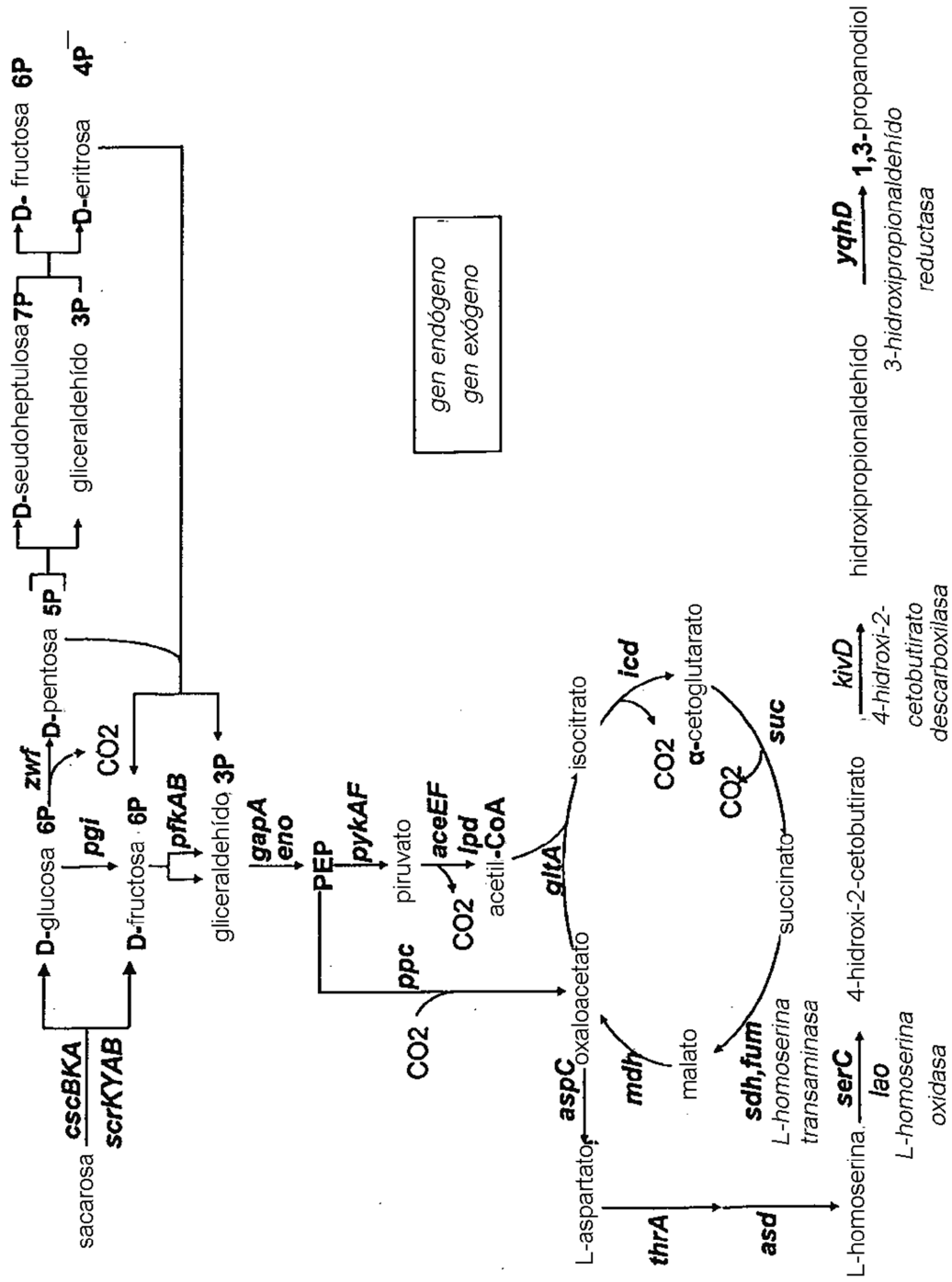


Fig. 1