



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 526**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/00 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03777548 .3**

96 Fecha de presentación : **06.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1576123**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Procedimiento para la producción biológica de 1,3-propanodiol con elevado rendimiento.**

30 Prioridad: **04.10.2002 US 416192 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

73 Titular/es:
E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
1007 Market Street
Wilmington, Delaware 19898, US
GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.

72 Inventor/es: **Cervin, Marguerite, A.;**
Soucaille, Phillipe y
Valle, Fernando

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 356 526 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

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención comprende un procedimiento para la bioconversión de una fuente de carbono fermentable en 1,3-propanodiol a través de un solo microorganismo.

ANTECEDENTES

1,3-Propanodiol es un monómero que tiene una utilidad potencial en la producción de fibras de poliéster y en la fabricación de poliuretanos y de compuestos cíclicos.

Se conoce una variedad de rutas químicas para el 1,3-propanodiol. Por ejemplo, el óxido de etileno se puede convertir en 1,3-propanodiol sobre un catalizador, en presencia de fosfina, agua, monóxido de carbono, hidrógeno y un ácido, mediante la hidratación catalítica de la fase de solución de acroleína, seguida por reducción, o partir de compuestos tales como glicerol, hecho reaccionar en presencia de monóxido de carbono y de hidrógeno sobre catalizadores que tienen átomos procedentes del grupo VIII de la tabla periódica. Aunque es posible generar 1,3-propanodiol por estos métodos, son costosos y generan corrientes residuales que contienen contaminantes ambientales.

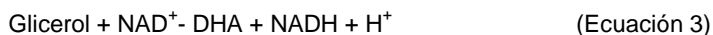
Desde hace un siglo se conoce que el 1,3-propanodiol se puede producir a partir de la fermentación de glicerol. Las cepas bacterianas capaces de producir 1,3-propanodiol se han encontrado, por ejemplo, en los grupos *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Ilyobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* y *Pelobacter*. En cada caso estudiado, el glicerol se convierte en 1,3-propanodiol en una secuencia en dos etapas de reacción catalizada con enzimas. En la primera etapa, una deshidratasa cataliza la conversión de glicerol a 3-hidroxiopropionaldehído (3-HPA) y agua, Ecuación 1. En la segunda etapa, 3-HPA se reduce a 1,3-propanodiol a través de una oxidorreductasa ligada a NAD⁺, Ecuación 2. El 1,3-propanodiol no se metaboliza adicionalmente y, consecuentemente,



se acumula en el medio. La reacción global consume un equivalente reductor en forma de cofactor, dinucleótido de β-nicotinamida y adenina reducido (NADH), que se oxida a dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺).

En *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* y *Clostridium pasteurianum*, los genes que codifican las tres subunidades estructurales de la deshidratasa de glicerol (*dhaB1-3* o *dhaB*, *C* y *E*) están situadas adyacentes a un gen que codifica una oxidorreductasa de 1,3-propanodiol (*dhaT*). Aunque la organización genética difiere algo entre estos microorganismos, estos genes están reunidos en un grupo que también comprende *orfX* y *orfZ* (genes que codifican un factor para la reactivación de la deshidratasa para la deshidratasa de glicerol), así como *orfY* y *orfW* (genes de función desconocida). Las oxidorreductasas específicas de 1,3-propanodiol (*dhaTs*) de estos microorganismos se sabe que pertenecen a la familia de las deshidrogenasas de alcohol de tipo III; cada una muestra un motivo conservado que se une a hierro y tiene preferencia hacia la interconversión ligada a NAD⁺/NADH, de 1,3-propanodiol y 3-HPA. Sin embargo, la interconversión ligada a NAD⁺/NADH, de 1,3-propanodiol y 3-HPA también está catalizada por deshidrogenasas de alcohol que no están ligadas específicamente a enzimas deshidratasas (por ejemplo, las deshidrogenasas de alcohol del hígado de caballo y de la levadura de Baker (E.C. 1.1.1.1)), no obstante con parámetros cinéticos menos eficaces. La deshidratasa de glicerol (E.C. 4.2.1.30) y la deshidratasa de diol[1,2-propanodiol] (E.C. 4.2.1.28) son enzimas relacionadas pero diferentes que están codificadas por distintos genes. Los genes de la deshidratasa de diol procedentes de *Klebsiella oxytoca* y *Salmonella typhimurium*, son similares a los genes de la deshidratasa de glicerol y están agrupados en un grupo que comprende genes análogos a *orfX* y *orfZ* (Daniel y otros, FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999); Toraya y Mori, J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999); GenBank AF026270).

La producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol se realiza generalmente bajo condiciones anaerobias usando glicerol como la única fuente de carbono y en ausencia de otros aceptores exógenos reductores equivalentes. Bajo estas condiciones, p. ej., en las cepas de *Citrobacter*, *Clostridium* y *Klebsiella*, una ruta paralela para el glicerol actúa de forma que en primer lugar implica la oxidación de glicerol a dihidroxiacetona (DHA) a través de una deshidrogenasa de glicerol ligada a NAD⁺ (o a NADP⁺), Ecuación 3. La DHA, después de la fosforilación a fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) a través de una cinasa de DHA (Ecuación 4),



está disponible para la biosíntesis y para auxiliar en la generación de ATP a través de, p. ej., la glicólisis. En contraposición con la ruta del 1,3-propanodiol, esta ruta puede proporcionar carbono y energía a la célula y produce más NADH del que consume.

En *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*, los genes que codifican las actividades ligadas funcionalmente de la deshidratasa de glicerol (*dhaB*), oxidorreductasa de 1,3-propanodiol (*dhaT*), deshidrogenasa de glicerol

(*dhaD*) y cinasa de dihidroxiacetona (*dhaK*), están incluidos en el regulón *dha*. El regulón *dha*, en *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii* también incluye un gen que codifica una proteína activadora de la transcripción (*dhaR*). Los regulones *dha* procedentes de *Citrobacter* y *Klebsiella* se han expresado en *Escherichia coli* y se ha observado que convierten el glicerol en 1,3-propanodiol.

Ni los métodos químicos ni los biológicos descritos anteriormente para la producción de 1,3-propanodiol, están bien adecuados para la producción a escala industrial ya que los procesos químicos requieren mucho gasto de energía y los procesos biológicos están limitados a títulos relativamente bajos, a partir de un material de partida costoso, el glicerol. Estos inconvenientes se podrían superar con un método que requiera un bajo aporte de energía y un material de partida económico, tal como hidratos de carbono o azúcares, o aumentando la eficacia metabólica de un proceso con glicerol. El desarrollo de cualquier método requerirá la capacidad de manipular la maquinaria genética responsable de la conversión de azúcares en glicerol y de glicerol en 1,3-propanodiol.

Los procesos biológicos para la preparación de glicerol son conocidos. La inmensa mayoría de productores de glicerol son levaduras, pero también se conocen algunas bacterias u hongos, y algas. Las bacterias y las levaduras producen glicerol convirtiendo la glucosa u otros hidratos de carbono a través de la ruta de la fructosa-1,6-bisfosfato en la glicolisis, o la ruta de Embden Meyerhof Parnas. El fosfato de dihidroxiacetona se convierte en glicerol-3-fosfato por la acción de la deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato, y el glicerol-3-fosfato se convierte en glicerol por la acción de la glicerol-3-fosfatasa.

El gen que codifica la deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato (DAR1, GPD1) se ha clonado y secuenciado a partir de *S. diastaticus* (Wang y otros, J. Bact. 176, 7091-7095 (1994)). El gen DAR1 se clonó en un vector transportador y se utilizó para transformar *E. coli*, en donde la expresión producía la enzima activa. Wang y otros (*supra*) reconocieron que DAR1 está regulado por el entorno osmótico celular pero no sugirieron cómo se podía utilizar el gen para mejorar la producción de 1,3-propanodiol en un microorganismo recombinante.

Se han aislado otras enzimas deshidrogenasas del glicerol-3-fosfato: por ejemplo, la deshidrogenasa de sn-glicerol-3-fosfato se ha clonado y secuenciado a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Larason y otros, Mol. Microbiol. 10, 1101 (1993)) y Albertyn y otros. (Mol. Cell. Biol. 14, 4135 (1994)) instruyen sobre la clonación de GPD1 que codifica una deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato procedente de *Saccharomyces cerevisiae*. Como Wang y otros. (*supra*), tanto Albertyn y otros como Larason y otros, reconocen la osmosensibilidad de la regulación de este gen, pero no sugieren cómo se podría utilizar el gen en la producción de 1,3-propanodiol en un microorganismo recombinante.

Igual que con G3PDH, la glicerol-3-fosfatasa se ha aislado a partir de *Saccharomyces cerevisiae* y se ha identificado que la proteína está codificada por los genes GPP1 y GPP2 (Norbeck y otros, J. Biol. Chem. 271, 13875 (1996)). De forma similar a los genes que codifican G3PDH, parece que GPP2 es osmosensible.

En el documento de patente WO 9634961 y Hernández-Montalvo y otros. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:186-191 (2001)) se describen cepas de *E. coli* que tienen fenotipos "PTS" negativo/glucosa positivo. En el documento de patente EP 1170376 A1 se describe la delección de un gen de la deshidratasa II de NADH, para mejorar el rendimiento energético. En el documento de patente WO 2001016346 se describe la utilidad de la "deshidrogenasa de aldehído A" y de la "deshidrogenasa de aldehído B" para la producción de ácido 3-hidroxipropiónico.

En el documento de patente WO 9635796 (US 5.686.276, E. I. du Pont de Nemours and Company ("DuPont")) se describe un método para la producción de 1,3-propanodiol a partir de un sustrato de carbono distinto del glicerol o de la dihidroxiacetona (especialmente, p. ej., glucosa), empleando un solo microorganismo que comprende una actividad deshidratasa. En el documento de patente WO 9928480 (DuPont) se describe un método similar con las ventajas derivadas de expresar actividades exógenas de una o de ambas, deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato y fosfatasa de glicerol-3-fosfato que alteran una o ambas actividades endógenas, cinasa de glicerol y deshidrogenasa de glicerol. En el documento de patente WO 9821339 (US 6.013.494, DuPont) se describe un procedimiento para la producción de 1,3-propanodiol usando un solo microorganismo que comprende deshidrogenasa exógena de glicerol-3-fosfato, fosfatasa de glicerol-3-fosfato, deshidratasa y oxidorreductasa de 1,3-propanodiol (p. ej., *dhaT*). En el documento de patente WO 9821341 (US 6.136.576, DuPont) se describe un método para la producción de 1,3-propanodiol que comprende un microorganismo recombinante que comprende además una deshidratasa y una proteína X (identificada posteriormente por ser un péptido del factor de reactivación de la deshidratasa). En el documento de patente WO 2001012833 (DuPont) se describe una mejora para el procedimiento en el que se obtiene un aumento significativo en el título (gramos de producto por litro) en virtud de una actividad catalítica no específica (que se distingue de la oxidorreductasa de 1,3-propanodiol, codificada por *dhaT*) para convertir 3-hidroxipropionaldehído en 1,3-propanodiol. El documento de patente de EE.UU. 10/420587 (2003) (US 60/374931 (2002) DuPont) describe vectores y plásmidos útiles para la producción de 1,3-propanodiol. Las solicitudes de DuPont se incorporan como referencia en la presente memoria descriptiva, tal y como si se expusieran en su totalidad en esta memoria.

La producción biológica de 1,3-propanodiol requiere glicerol como sustrato intermedio para una reacción secuencial en dos etapas, en la cual una enzima deshidratasa (típicamente una deshidratasa dependiente de la coenzima B₁₂) convierte glicerol en 3-hidroxipropionaldehído, que entonces se reduce a 1,3-propanodiol a través de una oxidorreductasa dependiente de NADH- (o NADPH-). La complejidad de los requisitos del cofactor requiere el uso de un catalizador de célula completa para un proceso industrial que utilice esta secuencia de reacción para la

producción de 1,3-propanodiol.

Una deficiencia específica en los procesos biológicos que conducen a la producción de 1,3-propanodiol a partir de glucosa, ha sido el bajo rendimiento del producto conseguido a través de la fermentación. En el documento de patente WO 2001012833 (DuPont) se describen los rendimientos en peso de 1,3-propanodiol a partir de glucosa dentro del intervalo de 24% y 35%. El problema que sigue sin resolverse es cómo producir 1,3-propanodiol biológicamente, con un rendimiento elevado y con un solo microorganismo, a partir de un sustrato económico de carbono, tal como glucosa u otros azúcares.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los solicitantes han resuelto el problema indicado. La presente invención proporciona la bioconversión de una fuente de carbono fermentable en 1,3-propanodiol, con un rendimiento más elevado que el obtenido previamente y con el uso de un solo microorganismo. El rendimiento obtenido es superior al 35% y preferiblemente superior al 40%. La glucosa se utiliza como sustrato modelo y *Escherichia coli* se utiliza como el microorganismo hospedador modelo, con las modificaciones y las alteraciones genéticas útiles detalladas en esta memoria.

Los solicitantes han proporcionado una cepa de *E. coli* que comprende:

- a) un sistema endógeno alterado de fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-glucosa que evita la expresión de las proteínas activas del sistema de la fosfotransferasa PEP-glucosa;
- b) un gen endógeno *galP* regulado por aumento que codifica el cotransporte unidireccional (de aquí en adelante, simportador) activo de galactosa-protón;
- c) un gen *glk* endógeno regulado por aumento que codifica una glucocinasa activa; y
- d) un gen *gapA* endógeno regulado por disminución que codifica una deshidrogenasa de glicerolaldehído-3-fosfato activa;

en donde el sistema endógeno alterado de la fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-glucosa comprende uno o varios entre

- a1) un gen endógeno alterado *ptsH* que evita la expresión de una proteína fosfotransportadora activa;
- a2) un gen endógeno alterado *ptsI* que evita la expresión de una fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-proteína activa; y
- a3) un gen endógeno alterado *crr* que evita la expresión de un componente activo IIA específico de glucosa;

en donde dicha cepa de *E. coli* comprende adicionalmente

- (i) una deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato;
- (ii) una glicerol-3-fosfatasa;
- (iii) una deshidratasa; y
- (iv) un factor de reactivación de la deshidratasa.

Las realizaciones de *E. coli* descritas anteriormente pueden comprender además uno o varios entre

- e) un gen endógeno alterado *arcA* que evita la expresión de una proteína activa para el control de la respiración aerobia;
- f) un gen endógeno *ppc* regulado por aumento que codifica una carboxilasa de fosfoenolpiruvato activa;
- g) un gen endógeno *btuR* regulado por aumento que codifica una adenosiltransferasa de cob(I)alamina activa; y
- h) un gen *yqhD* regulado por aumento que codifica una deshidrogenasa de alcohol activa.

Las realizaciones de *E. coli* descritas anteriormente pueden comprender uno o varios entre

- i) un gen endógeno alterado *mgsA* que evita la expresión de una sintasa de metilglioxal activa;
- j) un gen endógeno alterado *ackA* que evita la expresión de una cinasa de acetato activa;
- k) un gen endógeno alterado *pta* que evita la expresión de una fosfotransacetilasa activa;
- l) un gen endógeno alterado *aldA* que evita la expresión de una deshidrogenasa A de aldehído activa; y
- m) un gen endógeno alterado *aldB* que evita la expresión de una deshidrogenasa B de aldehído activa.

Las realizaciones de *E. coli* descritas anteriormente pueden comprender uno o varios entre:

- n) un gen endógeno alterado *edd* que evita la expresión de una deshidratasa de fosfogluconato activa;
- o) un gen endógeno alterado *glpK* que evita la expresión de una cinasa de glicerol activa; y
- p) un gen endógeno alterado *gldA* que evita la expresión de una deshidrogenasa de glicerol activa, dependiente de NADH.

5 El 1,3-propanodiol se bioproduce poniendo en contacto una cepa de *E. coli* descrita en esta memoria, con un sustrato adecuado de carbono, tal como glucosa, bajo condiciones adecuadas para la fermentación. El 1,3-propanodiol se bioproduce poniendo en contacto una cepa de *E. coli* descrita en esta memoria, comprendiendo la cepa de *E. coli* una:

- (i) deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato activa;
- 10 (ii) glicerol-3-fosfatasa activa;
- (iii) deshidratasa activa; y
- (iv) deshidratasa activa que reactiva la actividad;

con un sustrato adecuado de carbono, bajo condiciones adecuadas.

15 Además, cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente también puede incluir las estructuras artificiales pSYCO101, pSYCO103, pSYCO106, pSYCO109 o sus secuencias de nucleótidos correspondientes SEQ ID NOS:65, 66, 67 o 68.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

DESCRIPCIONES DE LA SECUENCIA Y DEPÓSITOS BIOLÓGICOS

20 La invención se puede entender más profundamente a partir de la siguiente descripción detallada, de la Figura 1, del listado de secuencias acompañante y de las descripciones y de los depósitos biológicos que forman parte de esta solicitud.

La Figura 1 muestra la producción de 1,3-propanodiol comparada entre dos fermentaciones, que se realizan esencialmente tal y como se describe en los MÉTODOS GENERALES. En un caso, la cepa utilizada era FMP::Km/pSYCO103. En el otro caso, la cepa utilizada era FMP/pSYCO103.

25 Las descripciones de 68 secuencias y el listado de secuencias unido a las mismas cumplen con las normas que regulan las descripciones de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos en solicitudes de patentes, según lo dispuesto en 37 C.F.R. §1.821-1.825 ("Requisitos para Solicitudes de Patente que Contienen Secuencias de Nucleótidos y/o de Aminoácidos – Las Normas de las Secuencias") y serán compatibles con la Norma ST2.5 (1988) de la Organización Mundial de la Propiedad Industrial (WIPO) y los requerimientos para el listado de patentes de la EPO y PCT (Normas 5.2 y 49.5 (a-bis) y Sección 208 y Anexo C de las Instrucciones de Administración). Las Descripciones de las Secuencias contienen el código de una letra para los caracteres de la secuencia de nucleótidos y los códigos de tres letras para los aminoácidos, tal y como se define conforme a las normas de IUPAC-IYUB descritas en "Nucleic Acids Res. 13, 3021-3030 (1985)" y "Biochemical Journal 219, 345-373 (1984)" que se incorporan en esta memoria como referencia.

35 SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótidos parcial de pLoxCat27 que codifica el casete *loxP*511-Cat-*loxP*511.

SEQ ID NOS:2-3 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para construir la alteración de *arcA*.

SEQ ID NOS:4-5 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para confirmar la alteración de *arcA*.

SEQ ID NO:6 es la secuencia parcial de nucleótidos de pLoxCat1 que codifica el casete *loxP*-Cat-*loxP*.

40 SEQ ID NOS:7-8 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para construir pR6KgalP, el plásmido molde para la sustitución con el promotor *trc*, del promotor cromosómico *galP*.

SEQ ID NOS:9-10 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para construir pR6Kglk, el plásmido molde para la sustitución con el promotor *trc*, del promotor cromosómico *glk*.

SEQ ID NO:11 es la secuencia de nucleótidos del casete del *loxP*-Cat-*loxP*-*Trc*.

45 SEQ ID NOS:12-13 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para confirmar la integración de SEQ ID NO:11 para la sustitución del promotor cromosómico *galP*.

SEQ ID NOS:14-15 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para confirmar la integración de SEQ ID NO:11 para la sustitución del promotor cromosómico *glk*.

SEQ ID NOS:16-17 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para construir la alteración *edd*.

SEQ ID NOs:18-19 son cebadores oligonucleótidos utilizados para confirmar la alteración de *edd*.

SEQ ID NO:20 es la secuencia de nucleótidos para el promotor *trc* seleccionado que controla la expresión de *glk*.

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos parcial para el promotor convencional *trc*.

5 SEQ ID NOs:22-23 son los cebadores de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *gapA*.

SEQ ID NOs:24-25 son los cebadores de oligonucleótidos utilizados para alterar el codón de iniciación de *gapA* a GTG.

SEQ ID NOs:26-27 son los cebadores de oligonucleótidos utilizados para alterar el codón de iniciación de *gapA* a TTG.

10 SEQ ID NO:28 es la secuencia de nucleótidos para el promotor corto 1.5 GI.

SEQ ID NOs:29-30 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para la sustitución del promotor cromosómico *gapA* por el promotor corto 1.5 GI.

SEQ ID NO:31 es la secuencia de nucleótidos para el promotor corto 1.20 GI.

SEQ ID NO:32 es la secuencia de nucleótidos para el promotor corto 1.6 GI.

15 SEQ ID NOs:33-34 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para la sustitución del promotor cromosómico *gapA* por el promotor corto 1.20 GI.

SEQ ID NO:35 es el cebador oligonucleótido con SEQ ID NO 33 que se utiliza para la sustitución del promotor cromosómico *gapA* por el promotor corto 1.6 GI.

SEQ ID NOs:36-37 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para construir la alteración de *mgsA*.

20 SEQ ID NOs:38-39 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para confirmar la alteración de *mgsA*.

SEQ ID NO:40-41 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para la sustitución del promotor cromosómico *ppc* por el promotor corto 1.6 GI.

SEQ ID NO:42 es un cebador de oligonucleótidos utilizado para confirmar la sustitución del promotor *ppc*.

25 SEQ ID NOs:43-44 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para la sustitución del promotor cromosómico *yciK-btuR* por el promotor corto 1.6 GI.

SEQ ID NOs:45-46 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para confirmar la sustitución del promotor *yciK-btuR*.

SEQ ID NOs:47-48 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para la sustitución del promotor cromosómico *yqhD* por el promotor corto 1.6 GI.

30 SEQ ID NO:49 es un cebador oligonucleótido utilizado para confirmar la sustitución del promotor *yqhD*.

SEQ ID NOs:50-51 son cebadores de oligonucleótido utilizados para construir la alteración de *pta-ackA*.

SEQ ID NOs:52-53 son cebadores de oligonucleótido utilizados para confirmar la alteración de *pta-ackA*.

SEQ ID NOs:54-55 son cebadores de oligonucleótido utilizados para construir la alteración de *ptsHIcrr*.

SEQ ID NO:56 es un cebador de oligonucleótido utilizado para confirmar la alteración de *ptsHIcrr*.

35 SEQ ID NOs:57-58 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para construir la alteración de *aldA*.

SEQ ID NOs:59-60 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para confirmar la alteración de *aldA*.

SEQ ID NOs:61-62 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para construir la alteración de *aldB*.

SEQ ID NOs:63-64 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para confirmar la alteración de *aldB*.

SEQ ID NO:65 es la secuencia de nucleótidos para el plásmido pSYCO101.

40 SEQ ID NO:66 es la secuencia de nucleótidos para el plásmido pSYCO103.

SEQ ID NO:67 es la secuencia de nucleótidos para el plásmido pSYCO106.

SEQ ID NO:68 es la secuencia de nucleótidos para el plásmido pSYCO109.

Los solicitantes han realizado los siguientes depósitos biológicos bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de

Patentes.

Referencia de Identificación del Depositante	Designación del Depósito Internacional	Fecha del Depósito
DH5α transformada de <i>E. coli</i> que contiene una porción del genoma de <i>Klebsiella</i> que codifica la enzima deshidratasa de glicerol	ATCC 69789	18 de Abril de 1995
DH5α transformada de <i>E. coli</i> que contiene un cósmido pKP4 que contiene una porción del genoma de <i>Klebsiella</i> que codifica una enzima deshidratasa de diol	ATCC 69790	18 de Abril de 1995
MSP33.6 de <i>E. coli</i>	ATCC 98598	25 de Noviembre de 1997
RJF 10m de <i>E. coli</i> mutante <i>glpK</i>	ATCC 98597	25 de Noviembre de 1997
<i>Escherichia coli</i> : RJ8n	ATCC PTA4216	9 de Abril de 2002
<i>Escherichia coli</i> : FMP':Km	ATCC PTA-4732	28 de Septiembre 2002

El(los) depósito(s) se mantendrán en el depósito internacional indicado durante al menos 30 años y estarán a disposición del público desde que se conceda una patente que lo describa. La disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para la puesta en práctica de la presente invención, en derogación de los derechos de la patente concedidos por acción del gobierno.

Tal y como se emplea en esta memoria, "ATCC" se refiere al depósito internacional de la "American Type Culture Collection", localizado en 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 EE.UU. El "número de la ATCC" es el número de orden dado a cultivos depositados en la ATCC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para la bioconversión de una fuente de carbono fermentable, directamente a 1,3-propanodiol, usando un solo microorganismo. El método se caracteriza por un rendimiento mejorado en 1,3- propanodiol a niveles no obtenidos previamente.

Las cepas hospedadoras descritas para la producción han sido manipuladas genéticamente para aumentar la eficacia metabólica de la ruta, incorporando diferentes mutaciones por delección que evitan la desviación del carbono a compuestos no productivos. Se contempla que las transformaciones y las mutaciones se pueden combinar de modo que se controlen actividades enzimáticas concretas para la mejora de la producción de 1,3-propanodiol. Por tanto, dentro del alcance de la presente invención se encuentra el anticipar modificaciones de un catalizador de la célula completa, que conducen a una producción incrementada de 1,3-propanodiol.

Términos y definiciones

La invención se puede entender de forma más extensa, haciendo referencia a los siguientes términos y definiciones utilizados en las reivindicaciones y en la memoria descriptiva.

Genes que se han delecionado:

Las expresiones "deshidrogenasa II de NADH", "NDH II" y "Ndh" se refieren a la deshidrogenasa de NADH de tipo II, una proteína que cataliza la conversión de ubiquinona-8 + NADH + H⁺ a ubiquinol-8 + NADH⁺. Típica de la deshidrogenasa II de NADH es EC 1.6.99.3. La deshidrogenasa II de NADH está codificada por *ndh* en *E. coli*.

Las expresiones "proteína de control de la respiración aeróbica" y "ArcA" se refieren a una proteína reguladora global. La proteína de control de la respiración aeróbica está codificada por *arcA* en *E. coli*.

Las expresiones "deshidratasa de fosfogluconato" y "Edd" se refieren a una proteína que cataliza la conversión de 6-fosfo-gluconato a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfo-gluconato + H₂O. Típica de la deshidratasa de fosfogluconato es EC 4.2.1.12. La deshidratasa de fosfogluconato está codificada por *edd* en *E. coli*.

Las expresiones "proteína fosfotransportadora HPr" y "PtsH" se refieren a la proteína fosfotransportadora codificada por *ptsH* en *E. coli*. Las expresiones "fosfotransferasa de la proteína fosfoenolpiruvato" y "PtsI" se refieren a la fosfotransferasa, EC 2.7.3.9, codificada por *ptsI* en *E. coli*. Las expresiones "sistema PTS", "componente IIA

específico de glucosa", y "Crr" se refieren a EC 2.7.1.69, codificada por *crr* en *E. coli*. PtsH, PtsI y Crr comprenden el sistema PTS.

La expresión "sistema de fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-azúcar", "sistema PTS", o "PTS" se refiere al sistema de absorción de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato.

5 Las expresiones "sintasa de metilglicoxal" y "MgsA" se refieren a una proteína que cataliza la conversión de dihidroxi-acetona-fosfato a metilglicoxal + fosfato. Típica de sintasa de metilglicoxal es EC 4.2.3.3. La sintasa de metilglicoxal está codificada por *mgsA* en *E. coli*.

10 Las expresiones "deshidrogenasa A de aldehído" y "AldA" se refieren a una proteína que cataliza la conversión de $H_2O + NAD^+ + \text{aldehído}$ a $NADH + \text{alcohol}$. Típica de la deshidrogenasa A de aldehído es EC 1.2.1.22. La deshidrogenasa A de aldehído está codificada por *aldA* en *E. coli*.

Las expresiones "deshidrogenasa B de aldehído" y "AldB" se refieren a una proteína que cataliza la conversión $H_2O + NAD^+ + \text{aldehído}$ a $NADH + \text{alcohol}$. Típica de la deshidrogenasa B de aldehído es EC 1.2.1.22. La deshidrogenasa B de aldehído está codificada por *aldB* en *E. coli*.

Genes cuya expresión se ha modificado:

15 Las expresiones "simportador galactosa-protón" y "GalP" se refieren a una proteína que cataliza el transporte de un azúcar y de un protón desde el periplasma al citoplasma. La D-glucosa es un sustrato preferido para GalP. El simportador galactosa-protón está codificado por *galP* en *E. coli*.

20 Los términos "glucocinasa" y "Glc" se refieren a una proteína que cataliza la conversión de D-glucosa + ATP a glucosa-6-fosfato + ADP. Típica de la glucocinasa es EC 2.7.1.2. La glucocinasa está codificada por *glk* en *E. coli*.

Las expresiones "deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato" y "GapA" se refieren a una proteína que cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato + fosfato + NAD^+ a 3-fosfo-D-glicerol-fosfato + $NADH + H^+$. Típica de la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato es EC 1.2.1.12. La deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato está codificada por *gapA* en *E. coli*.

25 Las expresiones "carboxilasa de fosfoenolpiruvato" y "Ppc" se refieren a una proteína que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato + $H_2O + CO_2$ a fosfato + ácido oxalacético. Típica de la carboxilasa de fosfoenolpiruvato es EC 4.1.1.31. La carboxilasa de fosfoenolpiruvato está codificada por *ppc* en *E. coli*.

El término "YciK" se refiere a una enzima putativa codificada por *yciK* que está acoplada en la traducción a *btuR*, el gen que codifica la adenosiltransferasa de Cob(I)alamina en *Escherichia coli*.

30 La expresión "adenosiltransferasa de Cob(I)alamina" se refiere a una enzima responsable de la transferencia de un resto desoxiadenosilo desde el ATP al corrinóide reducido. Típica de la adenosiltransferasa de Cob(I)alamina es EC 2.5.1.17. La adenosiltransferasa de Cob(I)alamina está codificada por el gen "*btuR*" (GenBank M21528) en *Escherichia coli*, "*cobA*" (GenBank L08890) en *Salmonella typhimurium* y "*cobO*" (GenBank M62866) en *Pseudomonas denitrificans*.

Definiciones adicionales:

La expresión "promotor corto 1.20 GI" se refiere a SEQ ID NO:31. La expresión "promotor corto 1.5 GI" se refiere a SEQ ID NO:28. Las expresiones "promotor corto 1.6 GI" y "promotor corto de tipo silvestre" se emplean de forma intercambiable y se refieren a SEQ ID NO:32.

40 Las expresiones "deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato" y "G3PDH" se refieren a un polipéptido responsable de una actividad enzimática que cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en glicerol-3-fosfato (G3P). G3PDH *in vivo* puede ser $NADH$; $NADPH$; o dependiente de FAD. Cuando se refiere específicamente a una deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato específica de un cofactor, se utilizarán las expresiones "deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato dependiente de $NADH$ ", "deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato dependiente de $NADPH$ " y "deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato dependiente de FAD". Ya que generalmente en el caso de la deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato dependiente de $NADH$ y dependiente de $NADPH$, las deshidrogenasas son capaces de emplear el $NADH$ y el $NADPH$ de forma intercambiable (por ejemplo, a través del gen codificado por *gpsA*), las expresiones deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato dependiente de $NADH$ y dependiente de $NADPH$ se utilizarán de forma intercambiable. La enzima dependiente de $NADH$ (EC 1.1.1.8) está codificada, por ejemplo, por diversos genes que incluyen GPD1 (GenBank Z74071x2) o GPD2 (GenBank Z35169x1) o GPD3 (GenBank G984182) o DAR1 (GenBank Z74071x2). La enzima dependiente de $NADPH$ (EC 1.1.1.94) está codificada por *gpsA* (GenBank U321643, (cds 197911-196892) G466746 y L45246). La enzima dependiente de FAD (EC 1.1.99.5) está codificada por GUT2 (GenBank Z47047x23) o *glpD* (GenBank G147838) o *glpABC* (GenBank M20938) (véase el documento de patente WO 9928480 y las referencias en el mismo, que se incorporan en esta memoria como referencia).

55 Las expresiones "glicerol-3-fosfatasa", "sn-glicerol-3-fosfatasa" o "d,l-glicerol fosfatasa" y "G3P fosfatasa" se refieren a un polipéptido responsable de una actividad enzimática que cataliza la conversión de glicerol-3-fosfato y

agua en glicerol y fosfato inorgánico. La G3P fosfatasa está codificada, por ejemplo, por GPP1 (GenBank Z47047x125) o GPP2 (GenBank U18813x11) (véase el documento de patente WO 9928480 y las referencias en el mismo que se incorporan en esta memoria como referencia).

La expresión "cinasa de glicerol" se refiere a un polipéptido responsable de una actividad enzimática que cataliza la conversión de glicerol y ATP a glicerol-3-fosfato y ADP. El donante de fosfato de gran energía, ATP, se puede sustituir por sustitutos fisiológicos (p. ej., fosfoenolpiruvato). La cinasa de glicerol está codificada, por ejemplo, por GUT1 (GenBank U11583x19) y *glpK* (GenBank L19201) (véase el documento de patente WO 9928480 y las referencias en el mismo que se incorporan en esta memoria como referencia).

La expresión "deshidrogenasa de glicerol" se refiere a un polipéptido responsable de una actividad enzimática que cataliza la conversión de glicerol a dihidroxiacetona (E.C. 1.1.1.6) o glicerol a gliceraldehído (E.C. 1.1.1.72). Un polipéptido responsable de una actividad enzimática que cataliza la conversión de glicerol a dihidroxiacetona también se denomina "reductasa de dihidroxiacetona". La deshidrogenasa de glicerol puede ser dependiente de NADH (E.C. 1.1.1.6), NADPH (E.C. 1.1.1.72) u otros cofactores (p. ej., E.C. 1.1.99.22). Una deshidrogenasa de glicerol dependiente de NADH está codificada, por ejemplo, por *gldA* (GenBank U00006) (véase el documento de patente WO 9928480 y las referencias en el mismo que se incorporan en esta memoria como referencia).

La expresión "enzima deshidratasa" o "deshidratasa" se refiere a cualquier actividad enzimática que catalice la conversión de una molécula de glicerol al producto 3-hidroxipropionaldehído. Para los fines de la presente invención, las enzimas deshidratasas incluyen una deshidratasa de glicerol (E.C. 4.2.1.30) y una deshidratasa de diol (E.C. 4.2.1.28) que tienen sustratos preferidos de glicerol y 1,2-propanodiol, respectivamente. Los genes para las enzimas deshidratasas se han identificado en *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium pasteurianum*, *Salmonella typhimurium*, y *Klebsiella oxitoca*. En cada caso, la deshidratasa está compuesta por tres subunidades: la subunidad grande o "α", la subunidad mediana o "β" y la subunidad pequeña o "γ". Debido a la amplia variación en la nomenclatura de genes utilizados en la bibliografía, en la Tabla 1 se proporciona un diagrama comparativo para facilitar la identificación. Los genes también se describen, por ejemplo, en Daniel y otros (FEMS Microbiol. Rev. 22, 553 (1999)) y Toraya y Mori (J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999)). Haciendo referencia a la Tabla 1, los genes que codifican la subunidad grande o "α", de la deshidratasa de glicerol, incluyen *dhaB1*, *gldA* y *dhaB*; los genes que codifican la subunidad mediana o "β", incluyen *dhaB2*, *gldB* y *dhaC*; los genes que codifican la subunidad pequeña o "γ", incluyen *dhaB3*, *gldC* y *dhaE*. También haciendo referencia a la Tabla 1, los genes que codifican la subunidad grande o "α" de la deshidratasa de diol incluyen *pduC* y *pddA*; los genes que codifican la subunidad mediana o "β" incluyen *pduD* y *pddB*; los genes que codifican la subunidad pequeña o "γ" incluyen *pduE* y *pddC*.

Tabla 1: Diagrama comparativo de los nombres de los genes y de las referencias de GenBank para las funciones de deshidratasa y las funciones ligadas a la deshidratasa.

FUNCIÓN GÉNICA:

	reguladora		desconocida		reactivación		1,3-PD deshidrogenasa		desconocida	
	gen	pb	gen	pb	gen	pb	gen	pb	gen	pb
ORGANISMO (Ref. de Gen-Bank)										
<i>K. pneumoniae</i> (SEQ ID NO:1)	<i>dhaR</i>	2209-4134	<i>orfW</i>	4112-4642	<i>OrfX</i>	4643-4996	<i>dhaT</i>	5017-6108	<i>orfY</i>	6202-6630
<i>K. pneumoniae</i> (U30903)			<i>orf2c</i>	7116-7646	<i>orf2b</i>	6762-7115	<i>dhaT</i>	5578-6741	<i>orf2a</i>	5125-5556
<i>K. pneumoniae</i> (U60992)					<i>GdrB</i>					
<i>C. freundii</i> (U09771)	<i>dheR</i>	3746-5671	<i>orfW</i>	5649-6179	<i>OrfX</i>	6180-6533	<i>dhaT</i>	6550-7713	<i>orfY</i>	7736-8164
<i>C. pasteurianum</i> (AF051373)										
<i>C. pasteurianum</i>			<i>orfW</i>	210-731	<i>OrfX</i>	1-196	<i>dhaT</i>	1232-	<i>orfY</i>	746-

	reguladora		desconocida		reactivación		1,3-PD deshidrogenasa		desconocida	
(AF006034)							2389		1177	
<i>S. typhimurium</i> (AF026270)					<i>PduH</i>	8274-8645				
<i>K. oxytoca</i> (AF017781)					<i>DdrB</i>	2063-2440				
<i>K. oxytoca</i> (AF051373)										

FUNCIÓN GÉNICA:

	deshidratasa α		deshidratasa β		deshidratasa γ		reactivación	
	gen	pb	gen	pb	gen	pb	gen	pb
ORGANISMO (Ref. de Gen-Bank)								
<i>K. pneumoniae</i> (SEQ ID NO:1)	<i>dhaB1</i>	7044-8711	<i>dhaB2</i>	8724-9308	<i>dhaB3</i>	9311-9736	<i>orfZ</i>	9749-11572
<i>K. pneumoniae</i> (U30903)	<i>dhaB1</i>	3047-4714	<i>dhaB2</i>	2450-2890	<i>dhaB3</i>	2022-2447	<i>dhaB4</i>	186-2009
<i>K. pneumoniae</i> (U60992)	<i>gldA</i>	121-1788	<i>gldB</i>	1801-2385	<i>GldC</i>	2388-2813	<i>gdrA</i>	
<i>C. freundii</i> (U09771)	<i>dhaB</i>	8556-10223	<i>dhaC</i>	10235-10819	<i>DhaE</i>	10822-11250	<i>orfZ</i>	11261-13072
<i>C. pasteurianum</i> (AF051373)	<i>dhaB</i>	84-1748	<i>dhaC</i>	1779-2318	<i>DhaE</i>	2333-2773	<i>orfZ</i>	2790-4598
<i>C. pasteurianum</i> (AF006034)								
<i>S. typhimurium</i> (AF026270)	<i>pduC</i>	3557-5221	<i>pduD</i>	5232-5906	<i>PduE</i>	5921-6442	<i>pduG</i>	6452-8284
<i>K. oxytoca</i> (AF017781)							<i>ddrA</i>	241-2073
<i>K. oxytoca</i> (AF051373)	<i>pddA</i>	121-1785	<i>pddB</i>	1796-2470	<i>PddC</i>	2485-3006		

- 5 Las deshidratasas de glicerol y de diol están sometidas a una inactivación basada en un mecanismo suicida a través de glicerol y algunos otros sustratos (Daniel y otros, FEMS. Microbiol. Rev. 22, 553 (1999)). La expresión "factor de reactivación de la deshidratasa" se refiere a las proteínas responsables de reactivar la actividad deshidratasa. Las expresiones "actividad reactivadora de la deshidratasa", "reactivando la actividad deshidratasa" o "regenerando la actividad deshidratasa", se refieren al fenómeno de convertir una deshidratasa que no es capaz de catalizar un sustrato, a una que es capaz de catalizar un sustrato o al fenómeno de inhibir la inactivación de una deshidratasa

o al fenómeno de extender la semi-vida útil de la enzima deshidratasa *in vivo*. Se han identificado dos proteínas que están implicadas como el factor de reactivación de la deshidratasa (véase el documento de patente WO 9821341 (US 6013494) y las referencias del mismo que se incorporan en esta memoria como referencia; Daniel y otros, *su- pra*; Toraya y Mori, J. Biol. Chem. 274, 3372 (1999); y Tobimatsu y otros, J. Bacteriol. 181, 4110 (1999)). Haciendo referencia a la Tabla 1, los genes que codifican una de las proteínas, incluyen *orfZ*, *dhaB4*, *gdrA*, *pduG* y *ddrA*. También haciendo referencia a la Tabla 1, los genes que codifican la segunda de las dos proteínas, incluyen *orfX*, *orf2b*, *gdrB*, *pduH* y *ddrB*.

Las expresiones "oxidorreductasa de 1,3-propanodiol", "deshidrogenasa de 1,3-propanodiol" o "DhaT", se refieren al(los) polipéptido(s) responsable(s) de una actividad enzimática que sea capaz de catalizar la interconversión de 3-HPA y 1,3-propanodiol, con la condición de que el(los) gen(es) que codifican tal actividad, esté ligado física o transcripcionalmente a una enzima deshidratasa en su entorno natural (es decir, de tipo silvestre); por ejemplo, el gen se encuentra dentro de un regulón de *dha* como en el caso de *dhaT* procedente de *Klebsiella pneumoniae*. Haciendo referencia a la Tabla 1, los genes que codifican una oxidorreductasa de 1,3-propanodiol incluyen *dhaT* procedente de *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* y *Clostridium pasteurianum*. Cada uno de estos genes codifica un polipéptido que pertenece a la familia de las deshidrogenasas de alcohol de tipo III, muestra un motivo conservado que se une a hierro, y tiene una preferencia hacia la interconversión ligada a NAD⁺/NADH de 3-HPA y 1,3-propanodiol (Johnson y Lin, J. Bacteriol. 169, 2050 (1987); Daniel y otros, J. Bacteriol. 177, 2151 (1995); y Leurs y otros, FEMS. Microbiol. Lett. 154, 337 (1997)). Las enzimas con propiedades físicas similares, se han aislado a partir de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus buchneri* (Veiga da Dunha y Foster, Appl. Environ. Microbiol. 58, 2005 (1992)).

La expresión "regulón *dha*" se refiere a un conjunto de genes asociados o marcos de lectura abiertos que codifican diferentes actividades biológicas, incluyendo, pero sin estar limitadas a las mismas, una actividad deshidratasa, una actividad de reactivación y una oxidorreductasa de 1,3-propanodiol. Típicamente, un regulón *dha* comprende los marcos de lectura abiertos *dhaR*, *orfY*, *dhaT*, *orfX*, *orfW*, *dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3* y *orfZ*, tal y como se describen en esta memoria.

La expresión "actividad catalítica no específica" se refiere al(los) polipéptido(s) responsable(s) de una actividad enzimática que es suficiente para catalizar la interconversión de 3-HPA y 1,3-propanodiol y excluye específicamente la(s) oxidorreductasa(s) de 1,3-propanodiol. Típicamente, estas enzimas son deshidrogenasas de alcohol. Tales enzimas pueden utilizar cofactores diferentes de NAD⁺/NADH, incluyendo pero no estando limitados a los mismos, flavinas tales como FAD o FMN. Un gen para una deshidrogenasa de alcohol no específica (*yqhD*) se encuentra, por ejemplo, que se codifica de forma endógena y se expresa funcionalmente expresado dentro de cepas K₁₂ de *E. coli*.

Las expresiones "función" o "función de la enzima" se refieren a la actividad catalítica de una enzima para alterar la energía requerida para realizar una reacción química específica. Se entiende que tal actividad se puede aplicar a una reacción en equilibrio, en donde la producción del producto o del sustrato se puede conseguir bajo condiciones adecuadas.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan de forma intercambiable.

Las expresiones "sustrato de carbono" y "fuente de carbono" se refieren a una fuente de carbono capaz de ser metabolizada por los microorganismos hospedadores de la presente invención y particularmente las fuentes de carbono seleccionadas a partir del grupo consistente en monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y sustratos de un carbono o mezclas de los mismos.

Las expresiones "célula hospedadora" o "microorganismo hospedador" se refieren a un microorganismo capaz de recibir genes extraños o heterólogos y de expresar esos genes para producir un producto génico activo.

Las expresiones "gen extraño", "ADN extraño", "gen heterólogo" y "ADN heterólogo" se refieren a material genético natural en un organismo que se ha colocado dentro de un microorganismo hospedador a través de diferentes medios. El gen de interés puede ser un gen presente en la naturaleza, un gen mutado o un gen sintético.

Los términos "transformación" y "transfección" se refieren a la adquisición de nuevos genes en una célula, después de la incorporación de ácido nucleico. Los genes adquiridos se pueden integrar en el ADN cromosómico o se pueden introducir como secuencias de replicación extracromosómicas. El término "transformante" se refiere al producto de una transformación.

La expresión "alterado genéticamente" se refiere al procedimiento de cambiar material hereditario mediante transformación o mutación.

Las expresiones "microorganismo recombinante" y "hospedador transformado" se refieren a cualquier microorganismo que tiene que ser transformado con genes heterólogos o genes extraños o copias extra de genes homólogos. Los microorganismos recombinantes de la presente invención expresan genes extraños que codifican la deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato (GPD1), la glicerol-3-fosfatasa (GPP2), la deshidratasa de glicerol (*dhaB1*, *dhaB2* y *dhaB3*), el factor de reactivación de la deshidratasa (*orfZ* y *orfX*) y, opcionalmente, la oxidorreductasa de 1,3-propanodiol (*dhaT*) para la producción de 1,3-propanodiol a partir de sustratos de carbono adecuados. Una reali-

zación preferida es una *E. coli* transformada con estos genes pero que carece de un *dhaT* funcional. Un microorganismo hospedador, distinto de *E. coli*, también se puede transformar para contener los genes descritos y el gen para la actividad catalítica no específica para la interconversión de 3-HPA y 1,3-propanodiol, excluyendo específicamente la(s) oxidorreductasa(s) de 1,3-propanodiol (*dhaT*).

5 "Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, que incluye las secuencias reguladoras que preceden (5' no codificadoras) y que siguen (3' no codificadoras) a la región codificadora. Los términos "natural" y de "tipo silvestre", se refieren a un gen tal y como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras.

10 Los términos "que codifica" y "codificante" se refieren al procedimiento por el cual un gen, a través de los mecanismos de transcripción y de traducción, produce una secuencia de aminoácidos. Se entiende que el procedimiento de codificar una secuencia específica de aminoácidos incluye secuencias de ADN que pueden implicar cambios de bases que no causan un cambio en el aminoácido codificado, o que implican cambios de bases que pueden alterar unos o varios aminoácidos, pero que no afectan a las propiedades funcionales de la proteína codificada por la secuencia de ADN. Por lo tanto, se entiende que la invención abarca más que las secuencias ejemplares específicas.

15 El término "aislado" se refiere a una proteína o a una secuencia de ADN que se elimina de, por lo menos, un componente con el cual está asociada naturalmente.

20 Una "molécula de ácido nucleico aislada" es un polímero de ARN o de ADN que es monocatenario o bica-tenario, opcionalmente que contiene bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Una molécula de ácido nucleico aislada en forma de un polímero de ADN, puede comprender uno o varios segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

25 "Sustancialmente similar" se refiere a moléculas de ácido nucleico en donde cambios en una o varias bases de nucleótidos dan como resultado la sustitución de uno o de varios aminoácidos, pero no afecta a las propiedades funcionales de la proteína codificada por la secuencia de ADN. "Sustancialmente similar" también se refiere a moléculas de ácido nucleico en donde cambios en una o en varias bases de nucleótidos no afectan a la capacidad de la molécula de ácido nucleico para mediar en la alteración de la expresión génica mediante tecnología de tipo complementario o cosupresión. "Sustancialmente similar" también se refiere a modificaciones de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención (tales como delección o inserción de una o de varias bases de nucleótidos) que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales del transcrito resultante, en relación con la capacidad para mediar en la alteración de la expresión génica por tecnología complementaria o cosupresión, o alteración de las propiedades funcionales de la molécula proteica resultante. La invención abarca otras secuencias además de las secuencias ejemplares específicas.

30 Por ejemplo, se conoce bien en la técnica que alteraciones en un gen que dan como resultado la producción de un aminoácido químicamente equivalente en un sitio dado, pero que no tienen efecto sobre las propiedades funcionales de la proteína codificada, son comunes. Para los fines de la presente invención, se han definido las sustituciones como intercambios dentro de uno de los siguientes grupos:

1. Pequeños residuos alifáticos, no polares o levemente polares: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2. Residuos polares, cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;
3. Residuos polares, cargados positivamente: His, Arg, Lys;
- 40 4. Residuos alifáticos largos, no polares: Met, Leu, Ile, Val (Cys); y
5. Residuos aromáticos largos: Phe, Tyr, Trp.

45 Así, un codón para el aminoácido alanina, un aminoácido hidrófobo, puede estar sustituido por un codón que codifica otro residuo menos hidrofóbico (tal como glicina) o un residuo más hidrófobo (tal como valina, leucina o isoleucina). De forma similar, cambios que dan como resultado la sustitución de un residuo cargado negativamente por otro (tal como ácido aspártico por ácido glutámico) o un residuo cargado positivamente por otro (tal como lisina por arginina), también se puede esperar que produzcan un producto funcionalmente equivalente.

En muchos casos, los cambios de nucleótidos que dan como resultado la alteración de las porciones N-terminal y C-terminal de la molécula de proteína, tampoco se esperaría que alteraran la actividad de la proteína.

50 Cada una de las modificaciones propuestas está en conformidad con las técnicas convencionales en la materia, tal como la determinación de la retención de la actividad biológica de los productos codificados. Por otra parte, el técnico experto reconoce que secuencias sustancialmente similares, incluidas en esta invención, también se definen por su capacidad para hibridarse, bajo condiciones rigurosas (0,1 X SSC, 0,1% de SDS, 65°C y lavado con 2X SSC, 0,1% de SDS seguido por 0,1 X SSC, 0,1% de SDS), con las secuencias ejemplificadas en esta memoria. Los fragmentos de ácido nucleico sustancialmente similares preferidos de la presente invención, son los fragmentos de ácido nucleico en los que sus secuencias de ADN son idénticas en al menos un 80% a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácido nucleico descritos en esta memoria. Los fragmentos de ácido nucleico más preferidos son idénticos.

ticas en al menos un 90% a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácido nucleico descritos en esta memoria. Los fragmentos de ácido nucleico más preferidos son al menos 95% idénticos a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácido nucleico descritos en esta memoria.

Un fragmento de ácido nucleico es "hibridable" con otro fragmento de ácido nucleico, tal como ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una forma monocatenaria del fragmento de ácido nucleico se puede reasociar con el otro fragmento de ácido nucleico, bajo condiciones apropiadas de temperatura y de fuerza iónica de la solución. Las condiciones de hibridación y de lavado se conocen bien y se ejemplifican en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), particularmente el capítulo 11 y la Tabla 11.1 en el libro (incorporado en esta memoria en su totalidad como referencia). Las condiciones de temperatura y la fuerza iónica determinan el "rigor" de la hibridación. Para el escrutinio preliminar de ácidos nucleicos homólogos, se pueden utilizar condiciones de hibridación poco rigurosas, que se corresponden a una Tm de 55°, p. ej., 5X SSC, 0,1% de SDS, 0,25% de leche y sin formamida; o 30% de formamida, 5X SSC, 0,5% SDS. Unas condiciones de hibridación moderadamente rigurosas se corresponden a una Tm más elevada, p. ej., 40% de formamida, con 5X o 6X SSC. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de lo rigurosa que sea la hibridación, son posibles emparejamientos incorrectos entre las bases. El rigor apropiado para hibridar los ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables que son bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor es el grado de similitud o de homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de Tm para los híbridos de los ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. La estabilidad relativa (que se corresponde a una Tm más elevada) de la hibridación de los ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para los híbridos con más de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido ecuaciones para calcular la Tm (véase Sambrook y otros, *supra*, 9.50-9.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los emparejamientos incorrectos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook y otros, *supra*, 11.7-11.8). En una realización, la longitud de un ácido nucleico hibridable es por lo menos aproximadamente 10 nucleótidos. Preferiblemente una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es de por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos; más preferiblemente de por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos; y lo más preferible la longitud es de por lo menos 30 nucleótidos. Además, el experto en la técnica reconocerá que la temperatura y la concentración en sales de la solución de lavado, se pueden ajustar según sea necesario según factores tales como la longitud de la sonda.

Una "porción sustancial" se refiere a un aminoácido o a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o la secuencia de nucleótidos de un gen, suficiente para permitir la identificación putativa de ese polipéptido o gen, mediante evaluación manual de la secuencia a través de una persona experta en la técnica, o por comparación de secuencias de forma automatizada por ordenador e identificación usando algoritmos tales como BLAST (del inglés, "Basic Local Alignment Search Tool", herramienta local básica de búsqueda de alineación; Altschul y otros, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1993); véase también www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Generalmente, una secuencia de diez o más aminoácidos contiguos o treinta o más nucleótidos es necesaria para identificar putativamente un polipéptido o una secuencia de ácido nucleico, como homólogo de una proteína o un gen conocido. Por otra parte, con respecto a secuencias de nucleótidos, las sondas de oligonucleótidos específicas del gen que comprenden 20-30 nucleótidos contiguos, se pueden utilizar en métodos dependientes de la secuencia para la identificación de genes (p. ej., hibridación de tipo Southern) y aislamiento (p. ej., hibridación *in situ* de colonias bacterianas o placas de bacteriófago). Además, oligonucleótidos cortos de 12-15 bases se pueden utilizar como cebadores de la amplificación en la PCR, para obtener una molécula de ácido nucleico particular, que comprende los cebadores. Por consiguiente, una "porción sustancial" de una secuencia de nucleótidos comprende una parte suficiente de la secuencia para permitir la identificación específica y/o el aislamiento de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia. La presente memoria descriptiva describe secuencias de aminoácidos y de nucleótidos parciales o completas que codifican una o varias proteínas particulares. El técnico experto, que tiene la ventaja de las secuencias tal y como se han descrito en esta memoria, puede usar ahora todas o una porción sustancial de las secuencias descritas, para el fin conocido por los expertos en la materia. Por consiguiente, la presente invención comprende las secuencias completas tal y como se describen en el Listado de Secuencias acompañante, así como las porciones sustanciales de las secuencias, tal y como se han definido anteriormente.

El término "complementario" describe la relación entre las bases de nucleótidos que son capaces de hibridarse entre sí. Por ejemplo, con respecto al ADN, la adenosina es complementaria de la timina y la citosina es complementaria de la guanina. Por consiguiente, la presente invención también incluye moléculas de ácido nucleico aisladas que son complementarias a las secuencias completas, tal y como se describen en el Listado de Secuencias acompañante, así como las secuencias de ácido nucleico sustancialmente similares.

La expresión "porcentaje de identidad", tal y como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o varias secuencias polipeptídicas o dos o varias secuencias polinucleotídicas, tal y como se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de asociación entre las secuencias polipeptídicas o las secuencias polinucleotídicas, de acuerdo con las circunstancias, según se determina por los emparejamientos entre las cadenas de tales secuencias. La "identidad" y la "similitud" se pueden calcular fácilmente por métodos conocidos, que incluyen pero no están limitados a los descritos en: "Computational Molecular Biology"; Lesk, A. M., compilador; Oxford University Press: Nueva York, 1988; "Biocomputing: Informatics and Genome Projects"; Smith, D.

W., compilador; Academic Press: Nueva York, 1993; "Computer Analysis of Sequence Data", parte I; Griffin, A. M. y Griffin, H. G., compiladores; Humana Press: New Jersey, 1994; "Sequence Analysis in Molecular Biology", von Hein-je, G., compilador; Academic Press: Nueva York, 1987; y "Sequence Analysis Primer", Gribbskov, M. y Devereux, J., compiladores; Stockton Press: Nueva York, 1991. Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar el mayor emparejamiento entre las secuencias sometidas a ensayo.

Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Los métodos preferidos de programas informáticos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a los mismos, el programa de GCG Pileup que se encuentra en el paquete del programa GCG, usando el algoritmo de Needleman y Wunsch con sus valores por defecto normalizados para la penalización por creación de espacios=12 y la penalización por la extensión de espacios=4 (Devereux y otros, *Nucleic Acids Res.* 12:387-395 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Pearson y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448 (1988)). El programa BLASTX está disponible al público en el NCBI y a través de otras fuentes (Manual de BLAST, Altschul y otros, *Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl. Library Med. (NCBI NLM) NIH, Bethesda, Md.* 20894; Altschul y otros, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul y otros, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). Otro método preferido para determinar el porcentaje de identidad es por el método del protocolo de alineación de proteínas DNASTAR, usando el algoritmo de Jotun-Hein (Hein y otros, *Methods Enzymol.* 183:626-645 (1990)). Los parámetros por defecto para el método de Jotun-Hein para alineaciones son: para las alineaciones múltiples, penalización por espacio=11, penalización por longitud del espacio=3; para alineaciones en parejas k-tuples=6. A modo de ilustración, a través de un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, una "identidad" del 95% con una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia, salvo que la secuencia polinucleotídica pueda incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. Es decir, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tenga una identidad de al menos 95% con una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden estar delecionados o sustituidos por otros nucleótidos, o una cantidad de nucleótidos de hasta el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia, pueden estar insertados en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones 5' o 3'-terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o varios grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. De forma análoga, con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos, por ejemplo, una identidad del 95% con una secuencia de aminoácidos de referencia, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sea idéntica a la secuencia de referencia, salvo que la secuencia polipeptídica puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos del aminoácido de referencia. Es decir, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95% con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 5% de los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede estar delecionado o sustituido por otro aminoácido, o un número de aminoácidos de hasta el 5% de los residuos de aminoácidos totales en la secuencia de referencia, se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden tener lugar en las posiciones del amino o del carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o varios grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

El término "homólogo" se refiere a una proteína o a un polipéptido natural o presente en la naturaleza en una célula hospedadora dada. La invención incluye microorganismos que producen proteínas homólogas a través de tecnología de ADN recombinante.

La expresión "porcentaje de homología" se refiere al grado de identidad en la secuencia de aminoácidos entre los polipéptidos. Cuando una primera secuencia de aminoácidos es idéntica a una segunda secuencia de aminoácidos, entonces la primera y la segunda secuencia de aminoácidos muestran una homología del 100%. La homología entre dos polipéptidos cualquiera, es una función directa del número total de aminoácidos emparejados en una posición dada, en cualquiera de las dos secuencias, p. ej., si la mitad del número total de aminoácidos en cualquiera de las dos secuencias es el mismo, entonces se dice que las dos secuencias muestran una homología del 50%.

La "degeneración del codón" se refiere a la divergencia en el código genético que permite la variación de la secuencia de nucleótidos sin afectar a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. El técnico experto es bien consciente de la "preferencia por un codón" mostrada por una célula hospedadora específica, en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por lo tanto, al sintetizar un gen para la expresión mejorada en una célula hospedadora, es deseable diseñar el gen de modo que su frecuencia de uso de codón se aproxime a la frecuencia de uso del codón preferido de la célula hospedadora.

Modificaciones de la secuencia, tales como deleciones, inserciones o sustituciones en la secuencia que producen cambios silenciosos que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales de la molécula de proteína resultante, también se contemplan. Por ejemplo, se contempla la alteración de la secuencia del gen que refleja la degeneración del código genético, o que da como resultado la producción de un aminoácido químicamente equivalente, en un sitio dado. Así, un codón para el aminoácido alanina, un aminoácido hidrófobo, se puede sustituir por un codón que codifica otro residuo menos hidrófobo, tal como glicina, o un residuo más hidrófobo, tal como vali-

na, leucina o isoleucina. De forma similar, cambios que dan como resultado la sustitución de un residuo cargado negativamente por otro, tal como ácido aspártico por ácido glutámico, o un residuo cargado positivamente por otro, tal como lisina por arginina, también se puede esperar que produzcan un producto biológicamente equivalente. Cambios de nucleótidos que dan como resultado la alteración de las porciones N-terminales y C-terminales de la molécula de proteína, tampoco se esperaría que alteren la actividad de la proteína. En algunos casos, puede ser de hecho deseable producir mutantes de la secuencia para estudiar el efecto de la alteración sobre la actividad biológica de la proteína. Cada una de las modificaciones propuestas está dentro de la técnica convencional, al igual que la determinación de la conservación de la actividad biológica en los productos codificados. Por otra parte, el técnico experto reconoce que las secuencias abarcadas por esta invención, también se definen por su capacidad de hibridación, bajo condiciones rigurosas (0,1X SSC, 0,1% de SDS, 65°C), con las secuencias ejemplificadas en esta memoria.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y a la traducción en un producto génico a partir de un gen que codifica la secuencia del producto génico.

Los términos "plásmido", "vector" y "casete", se refieren a un elemento extracromosómico que es portador frecuentemente de genes que no forman parte del metabolismo central de la célula, y generalmente está en forma de moléculas de ADN circulares bicatenarias. Tales elementos pueden ser secuencias que se replican de forma autónoma, secuencias que integran el genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, de ADN o ARN lineal o circular, mono o bicatenario, obtenidas a partir de cualquier fuente, en las que se ha reunido una cantidad de secuencias de nucleótidos o se han recombinado en una única estructura artificial que es capaz de introducir en una célula un fragmento de promotor y una secuencia de ADN para un producto génico seleccionado, junto con una secuencia 3' sin traducir adecuada. Un "casete de transformación" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos, además del gen extraño, que facilitan la transformación de una célula hospedadora concreta. El "casete de expresión" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos, además del gen extraño, que permiten una expresión mejorada de ese gen en un hospedador extraño.

Construcción de organismos recombinantes

Los organismos recombinantes que contienen los genes necesarios que codificarán la ruta enzimática para la conversión de un sustrato de carbono en 1,3-propanodiol, se pueden construir usando métodos bien conocidos en la técnica. Los genes que codifican la deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato (GPD1), glicerol-3-fosfatasa (GPP2), deshidratasa de glicerol (*dhaB1*, *dhaB2* y *dhaB3*), el factor de reactivación de la deshidratasa (*orfZ* y *orfX*) y la oxidoreductasa de 1,3-propanodiol (*dhaT*), se aislaron a partir de un hospedador natural tal como *Klebsiella* o *Saccharomyces* y se utilizaron para transformar cepas hospedadoras tales como *E. coli* DH5a, ECL707, AA200, o KLP23.

Aislamiento de genes

Los métodos para obtener los genes deseados a partir de un genoma bacteriano son comunes y bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Por ejemplo, si se conoce la secuencia del gen, se pueden crear genotecas genómicas adecuadas mediante digestión con endonucleasas de restricción y se pueden seleccionar con sondas complementarias a la secuencia génica deseada. Una vez que se aísla la secuencia, el ADN se puede amplificar usando métodos convencionales de amplificación dirigidos con cebador, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (documento de patente de EE.UU. 4.683.202) para obtener cantidades de ADN adecuadas para la transformación usando vectores apropiados.

Alternativamente, las genotecas de cósmidos se pueden crear cuando grandes segmentos de ADN genómico (35-45 kb) se pueden empaquetar en vectores y se emplean para transformar hospedadores apropiados. Los vectores cósmidos son los únicos que son capaces de acomodar grandes cantidades de ADN. Los vectores cósmidos tienen generalmente por lo menos una copia de la secuencia de ADN cos que es necesaria para el empaquetamiento y la posterior circularización del ADN extraño. Además de la secuencia cos, estos vectores también contendrán un origen de replicación, tal como ColE1 y marcadores de resistencia a fármacos, tales como un gen resistente a la ampicilina o a la neomicina. Los métodos para usar los vectores cósmidos para la transformación de hospedadores bacterianos adecuados, se describen con detalle en Sambrook, J. y otros, *supra*.

Típicamente para clonar cósmidos, el ADN extraño se aísla usando las endonucleasas de restricción apropiadas y se liga de forma adyacente a la región cos del vector del cósmido, usando las ligasas apropiadas. Los vectores de cósmidos que contienen ADN extraño linealizado, reaccionan a continuación con un vehículo para empaquetar el ADN, tal como un bacteriófago. Durante el proceso de empaquetamiento, los sitios cos se escinden y el ADN extraño se empaqueta en la porción de la cabeza de la partícula vírica bacteriana. A continuación, estas partículas se utilizan para transfectar células hospedadoras adecuadas, tales como *E. coli*. Una vez inyectado en la célula, el ADN extraño se circulariza bajo la influencia de los extremos cohesivos de cos. De esta manera, se pueden introducir grandes segmentos de ADN extraño y expresarlos en células hospedadoras recombinantes.

Aislamiento y clonación de los genes que codifican la deshidratasa de glicerol (*dhaB1*, *dhaB2* y *dhaB3*), los factores que reactivan la deshidratasa (*orfZ* y *orfX*) y la deshidrogenasa de 1,3-propanodiol (*dhaT*)

Los vectores cósmidos y los métodos para la transformación de cósmidos se utilizan dentro del contexto de la presente invención para clonar grandes segmentos de ADN genómico, procedente de géneros bacterianos cono-

cidos por poseer genes capaces de procesar el glicerol en 1,3-propanodiol. Específicamente, el ADN genómico de *K. pneumoniae* fue aislado por métodos bien conocidos en la técnica y digerido con la enzima de restricción Sau3A, para la inserción en un vector cósmido Supercos 1 y empaquetado empleando extractos para el empaquetamiento de GigapackII. Después de la construcción del vector de *E. coli* XL1-Blue, se transformaron células MR con el ADN del cósmido. Los transformantes se escrutaron para estudiar la capacidad de convertir glicerol en 1,3-propanodiol, haciendo crecer las células en presencia de glicerol y analizando el medio para observar la formación de 1,3-propanodiol.

Se analizaron dos de los transformantes positivos para 1,3-propanodiol y los cósmidos se denominaron pKP1 y pKP2. La secuenciación del ADN reveló una homología extensa con el gen de la deshidratasa de glicerol procedente de *C. freundii*, mostrando que estos transformantes contenían ADN que codificaba el gen de la deshidratasa de glicerol. Se analizaron otros transformantes positivos para el 1,3-propanodiol y los cósmidos se denominaron pKP4 y pKP5. La secuenciación del ADN reveló que estos cósmidos eran portadores de ADN que codificaba un gen de la deshidratasa de diol.

Aunque la presente invención utiliza los genes aislados a partir de un cósmido de *Klebsiella*, fuentes alternativas de genes de la deshidratasa y de genes del factor de reactivación de la deshidratasa incluyen, pero no están limitados a los mismos, *Citrobacter*, *Clostridia* y *Salmonella* (véase la Tabla 1).

Genes que codifican G3PDH y la fosfatasa de G3P

La presente invención proporciona genes adecuados para la expresión de actividades G3PDH y fosfatasa de G3P en una célula hospedadora.

Los genes que codifican G3PDH son conocidos. Por ejemplo, GPD1 se ha aislado a partir de *Saccharomyces* (Wang y otros, *supra*). De forma similar, la actividad de G3PDH también se ha aislado a partir de *Saccharomyces*, codificada por GPD2 (Eriksson y otros, Mol. Microbiol. 17, 95 (1995)).

Para los fines de la presente invención, se contempla que cualquier gen que codifica un polipéptido responsable de la actividad G3PDH dependiente de NADH es adecuado, en donde esa actividad es capaz de catalizar la conversión de fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) en glicerol-3-fosfato (G3P). Además, se contempla que cualquier gen que codifica la secuencia de aminoácidos de G3PDH dependiente de NADH que se corresponde con los genes DAR1, GPD1, GPD2, GPD3, y *gpsA* será funcional en la presente invención, en donde esa secuencia de aminoácidos puede abarcar sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos que no alteran la función de la enzima. La persona experta en la técnica apreciará que los genes que codifican G3PDH aislados a partir de otras fuentes, también serán adecuados para el empleo en la presente invención. Los genes que codifican la fosfatasa de G3P son conocidos. Por ejemplo, GPP2 se ha aislado a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Norbeck y otros, J. Biol. Chem. 271, 13875 (1996)).

Para los fines de la presente invención, cualquier gen que codifica una actividad fosfatasa de G3P es adecuado para el uso en el método, en donde esa actividad es capaz de catalizar la conversión de glicerol-3-fosfato más H₂O en glicerol más fosfato inorgánico. Además, cualquier gen que codifica la secuencia de aminoácidos de la fosfatasa de G3P que se corresponde con los genes GPP2 y GPP1, será funcional en la presente invención, incluyendo cualquier secuencia de aminoácido que abarque sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos que no alteren la función de la enzima fosfatasa de G3P. La persona experta en la técnica apreciará que los genes que codifican la fosfatasa de G3P, aislada a partir de otras fuentes, también serán adecuados para el uso en la presente invención.

Células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para la producción recombinante de 1,3-propanodiol pueden ser procariontes o eucariontes y estarán limitadas solamente por la capacidad de la célula hospedadora para expresar las enzimas activas para la ruta del 1,3-propanodiol. Las células hospedadoras adecuadas serán microorganismos tales como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Mucor*, *Torulopsis*, *Methylobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Pseudomonas*. Se prefieren en la presente invención *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Aerobacter*. La más preferida es *E. coli* (KLP23 (documento de patente WO 2001012833 A2), RJ8.n (ATCC PTA-4216), *E. coli*: FMP':Km (ATCC PTA4732), MG 1655 (ATCC 700926)).

Vectores y casetes de expresión

La presente invención proporciona una variedad de vectores y casetes de transformación y de expresión adecuados para la clonación, la transformación y la expresión factor G3PDH, fosfatasa de G3P, deshidratasa y factor de reactivación de la deshidratasa, en una célula hospedadora adecuada. Los vectores adecuados serán los que sean compatibles con el microorganismo empleado. Los vectores adecuados se pueden obtener, por ejemplo, a partir de una bacteria, un virus (tal como el bacteriófago T7 o M-13 obtenido a partir de un fago), un cósmido, una levadura o una planta. Los protocolos para obtener y usar tales vectores son conocidos en la técnica (Sambrook y otros, *supra*).

Las regiones de control de la iniciación, o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de los genes de G3PDH y de la fosfata de G3P (DAR1 y GPP2, respectivamente) en la célula hospedadora deseada, son numerosas y conocidas por los expertos en la materia. Virtualmente, cualquier promotor capaz de dirigir estos genes, es adecuado para la presente invención, que incluye pero no está limitada a los mismos, CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO y TPI (útil para la expresión en *Saccharomyces*); AOX1 (útil para la expresión en *Pichia*); y lac, trp, λP_L , λP_R , T7, tac y trc (útiles para la expresión en *E. coli*).

Las regiones de control de la terminación también se pueden obtener a partir de diferentes genes naturales para los hospedadores preferidos. Opcionalmente, un sitio de terminación puede ser superfluo; sin embargo, se prefiere más si está incluido.

Para la expresión eficaz de las presentes enzimas, los ADNs que codifican las enzimas están ligados funcionalmente a través de codones de iniciación a regiones seleccionadas para el control de la expresión, de modo que esta expresión tiene como resultado la formación del ARN mensajero apropiado.

Particularmente útiles en la presente invención son los vectores pSYCO101, pSYCO103, pSYCO106 y pSYCO109. Los elementos esenciales se obtienen a partir del regulón *dha*, aislado a partir de *Klebsiella pneumoniae* y *Saccharomyces cerevisiae*. Cada uno contiene los marcos de lectura abiertos *dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3*, *dhaX*, *orfX*, DAR1 y GPP2 dispuestos en tres operones separados, cuyas secuencias de nucleótidos se proporcionan en SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67 y ID SEQ NO: 68, respectivamente. Las diferencias entre los vectores se ilustran en el diagrama más abajo [el prefijo "p-" indica un promotor; los marcos de lectura abiertos contenidos en cada uno "()" representan la composición de un operón]:

pSYCO101 (SEQ ID NO:65):

p-trc (Dar1_GPP2) en orientación opuesta comparado con los otros 2 operones de la ruta,

p-1.6 long GI (*dhaB1_dhaB2_dhaB3_dhaX*), y

p-1.6 long GI (*orfY_orfX_orfW*).

pSYCO103 (SEQ ID NO:66):

p-trc (Dar1_GPP2) misma orientación comparado con los otros 2 operones de la ruta,

p-1.5 long GI (*dhaB1_dhaB2_dhaB3_dhaX*) y

p-1.5 long GI (*orfY_orfX_orfW*).

pSYCO106 (SEQ ID NO:67):

p-trc (Dar1_GPP2) misma orientación comparado con los otros 2 operones de la ruta

p-1.6 long GI (*dhaB1_dhaB2_dhaB3_dhaX*), y

p-1.6 long GI (*orfY_orfX_orfW*).

pSYCO109 (SEQ ID NO:68):

p-trc (Dar1_GPP2) misma orientación comparada con los otros 2 operones de la ruta

p-1.6 long GI (*dhaB1_dhaB2_dhaB3_dhaX*), y

p-1.6 long GI (*orfY_orfK*).

Transformación de hospedadores adecuados y expresión de los genes para la producción de 1,3-propanodiol

Una vez que se han construido los casetes adecuados, se emplean para transformar células hospedadoras apropiadas. La introducción del casete que contiene los genes que codifican G3PDH, fosfatasa de G3P, deshidratasa y el factor de reactivación de la deshidratasa, en la célula hospedadora, se puede conseguir por procedimientos conocidos, tales como mediante transformación (p. ej., usando células permeables al calcio, electroporación), o mediante transfección usando un virus de fago recombinante (Sambrook y otros, *supra*).

En la presente invención, se emplean casetes para transformar *E. coli*, tal y como se describe con detalle en los MÉTODOS GENERALES y los EJEMPLOS.

Mutantes

Además de las células ejemplificadas, se contempla que el presente método es capaz de hacer uso de células que tienen una o múltiples mutaciones diseñadas específicamente para mejorar la producción de 1,3-propanodiol. Las células que normalmente desvían un material de alimentación de carbono hacia rutas no productivas, o que muestran una represión significativa del catabolito, se podrían mutar para evitar estas deficiencias fenotípicas.

picas. Por ejemplo, muchas células de tipo silvestre están sometidas a una represión por catabolito a través de glucosa y de subproductos en el medio y se contempla que cepas mutantes de estos organismos de tipo silvestre, capaces de producir 1,3-propanodiol que son resistentes a la represión de la glucosa, serían particularmente útiles en la presente invención.

Los métodos para crear mutantes son comunes y bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células de tipo silvestre se pueden exponer a una variedad de agentes, tales como a la radiación o mutágenos químicos y escrutarlas a continuación en busca del fenotipo deseado. Cuando se crean mutaciones mediante radiación, se puede utilizar la radiación ultravioleta (UV) o la radiación ionizante. Las longitudes de onda UV de onda corta para las mutaciones genéticas, estarán dentro del intervalo de 200 nm a 300 nm, en donde se prefieren 254 nm. La radiación UV en esta longitud de onda, causa cambios principalmente dentro de la secuencia de ácido nucleico, de guanidina y citosina a adenina y timidina. Puesto que todas las células tienen mecanismos de reparación del ADN que repararían la mayoría de las mutaciones inducidas con UV, se pueden añadir agentes tales como la cafeína y otros inhibidores para interrumpir el proceso de reparación y maximizar el número de mutaciones eficaces. Las mutaciones con luz UV de onda larga que usan luz en el intervalo de 300 nm a 400 nm también son posibles, pero generalmente no son tan eficaces como la luz UV de onda corta, a menos que se utilice junto con diferentes activadores, tales como colorantes de psoralén que interaccionan con el ADN.

La mutagénesis con agentes químicos también es eficaz para generar mutantes y las sustancias de uso general incluyen productos químicos que afectan a la falta de replicación del ADN, tales como HNO_2 y NH_2OH , así como agentes que afectan a la replicación del ADN, tales como colorantes de acridina, valiosos para causar mutaciones por cambio del marco de lectura. Métodos específicos para crear mutantes usando radiación o agentes químicos, están bien documentados en la técnica. Véase, por ejemplo, Thomas D. Brock en "Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology" segunda edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA., o Deshpande, Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol. 36, 227 (1992), incorporados en esta memoria como referencia.

Después de que la mutagénesis haya tenido lugar, los mutantes que tienen el fenotipo deseado se pueden seleccionar por una variedad de métodos. El escrutinio aleatorio es el más común, en donde las células mutagenizadas se seleccionan por la capacidad de producir el producto o el producto intermedio deseados. Alternativamente, el aislamiento selectivo de los mutantes se puede realizar haciendo crecer una población mutagenizada sobre medios selectivos, en donde sólo se pueden desarrollar las colonias resistentes. Los métodos de selección de mutantes están muy desarrollados y se conocen bien en la técnica de la microbiología industrial. Véase, por ejemplo, Brock, *supra*; DeMancilha y otros, Food Chem. 14, 313 (1984).

Además de los métodos para crear mutantes descritos anteriormente, los genes seleccionados implicados en convertir el sustrato de carbono en 1,3-propanodiol se pueden para regular por aumento o regular por disminución, según una variedad de métodos, que son conocidos por los expertos en la materia. Se entenderá que aumentar la regulación o disminuir la regulación de un gen se refiere a una alteración en la actividad de la proteína codificada por ese gen, en relación con un nivel testigo de la actividad, por ejemplo, por la actividad de la proteína codificada por el gen de tipo silvestre (o no alterado) correspondiente.

Regulación por aumento:

Los genes específicos implicados en una ruta enzimática se pueden regular por aumento para incrementar la actividad de su(s) función(es) codificada(s). Por ejemplo, copias adicionales de genes seleccionados se pueden introducir en la célula hospedadora sobre plásmidos multicopia, tales como pBR322. Tales genes también se pueden integrar en el cromosoma con secuencias reguladoras apropiadas, que dan como resultado una actividad incrementada de sus funciones codificadas. Los genes diana se pueden modificar de forma que estén bajo el control de promotores no naturales o de promotores naturales alterados. Los promotores endógenos se pueden alterar *in vivo* por mutación, delección y/o sustitución.

Regulación por disminución:

Alternativamente, puede ser útil reducir o eliminar la expresión de determinados genes en relación con un nivel dado de actividad. Para los fines de esta invención, es útil distinguir entre disminución y eliminación. Las expresiones "regulación por disminución" y "regulando por disminución" un gen, se refieren a una reducción, pero no a una eliminación total, de la actividad de la proteína codificada. Los métodos de regulación por disminución y de rotura de genes son conocidos por los especialistas en la técnica.

La regulación por disminución puede tener lugar por delección, inserción o alteración de las regiones codificadoras y/o de las regiones reguladoras (promotor). Regulaciones por disminución específicas se pueden obtener mediante mutación aleatoria seguida de escrutinio o selección, o, cuando se conoce la secuencia génica, mediante la intervención directa por métodos de biología molecular conocidos por los expertos en la materia. Un método particularmente útil, pero no exclusivo, para efectuar la disminución de la regulación, es alterar la fuerza del promotor.

Alteración:

Las alteraciones de genes pueden tener lugar, por ejemplo, mediante 1) la delección de regiones codificadoras y/o regiones reguladoras (promotor), 2) la inserción de secuencias de ácido nucleico exógenas en las regiones

codificadoras y/o regiones reguladoras (promotor), y 3) la alteración de las regiones codificadoras y/o regiones reguladoras (promotor) (por ejemplo, mediante cambios en las pb del ADN). Tales cambios evitarían la expresión de la proteína de interés o darían como resultado la expresión de una proteína que es no funcional. Alteraciones específicas se pueden obtener por mutación aleatoria seguida por escrutinio o selección, o, en casos en los que las secuencias génicas son conocidas, las alteraciones específicas se puedan obtener mediante intervención directa, usando métodos de biología molecular conocidos por los expertos en la materia. Un método particularmente útil es la delección de cantidades significativas de regiones codificadoras y/o de regiones reguladoras (promotor).

Los métodos para alterar la expresión de la proteína recombinante son conocidos por los expertos en la materia, y se describen en parte en Baneyx, Curr. Opin. Biotech. (1999) 10:411; Ross y otros, J. Bacteriol. (1998) 180:5375; deHasey y otros, J. Bacteriol. (1998) 180:3019; Smolke y Keasling, Biotech. And Bioengineering (2002) 80:762; Swartz, Curr. Opin. Biotech. (2001) 12:195; y Ma y otros, J. Bacteriol. (2002) 184:5733.

Alteraciones en la ruta de producción de 1,3-propanodiol

Ruta enzimática representativa. La producción de 1,3-propanodiol a partir de glucosa se puede realizar mediante la siguiente serie de etapas. Esta serie es representativa de un número de rutas conocidas por los expertos en la materia. La glucosa se convierte en una serie de etapas en fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) y 3-fosfoglicerinaldehído (3-PG) mediante enzimas de la ruta glicolítica. A continuación se forma glicerol mediante la hidrólisis de DHAP a dihidroxiacetona (DHA) seguida de una reducción, o la reducción de DHAP a glicerol-3-fosfato (G3P) seguida de hidrólisis. La etapa de hidrólisis se puede catalizar a través de una cantidad cualquiera de fosfatasaes celulares, que son conocidas por ser inespecíficas en relación con sus sustratos, o la actividad se puede introducir en el hospedador mediante recombinación. La etapa de reducción se puede catalizar con una enzima del hospedador ligada a NAD^+ (o a NADP^+) o la actividad se puede introducir en el hospedador mediante recombinación. Es notable que el regulón *dha* contenga una deshidrogenasa de glicerol (E.C. 1.1.1.6) que cataliza la reacción reversible de la Ecuación 3.



El glicerol se convierte en 1,3-propanodiol a través del compuesto intermedio 3-hidroxi-propionaldehído (3-HPA), tal y como se ha sido descrito detalladamente más arriba. El compuesto intermedio 3-HPA se produce a partir de glicerol, Ecuación 1, mediante una enzima deshidratasa que puede estar codificada por el hospedador o se puede introducir en el hospedador mediante recombinación. Esta deshidratasa puede ser deshidratasa de glicerol (E.C. 4.2.1.30), deshidratasa de diol (E.C. 4.2.1.28) o cualquier otra enzima capaz de catalizar esta transformación. La deshidratasa de glicerol, pero no la deshidratasa de diol, está codificada por el regulón *dha*. El 1,3-propanodiol se produce a partir de 3-HPA, Ecuación 2, mediante una enzima del hospedador ligada a NAD^+ (o a NADP^+) o la actividad se puede introducir en el hospedador mediante recombinación. Esta reacción final en la producción de 1,3-propanodiol puede estar catalizada por la deshidrogenasa de 1,3-propanodiol (E.C. 1.1.1.202) u otras deshidrogenasas de alcohol.

Mutaciones y transformaciones que afectan a la canalización del carbono. Una variedad de microorganismos mutantes que comprenden variaciones en la ruta de producción del 1,3-propanodiol, serán útiles en la presente invención. Mutaciones que bloquean las rutas alternativas para los compuestos intermedios de la ruta de producción del 1,3-propanodiol, también serían útiles para la presente invención. Por ejemplo, la eliminación de la cinasa de glicerol evita que el glicerol, formado a partir de G3P por la acción de la fosfatasa de G3P, se reconvierta a G3P a expensas de ATP. También, la eliminación de la deshidrogenasa de glicerol (por ejemplo, *gldA*) evita que el glicerol, formado a partir de DHAP por la acción de la deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato dependiente de NADH, se convierta en dihidroxiacetona. Las mutaciones se pueden dirigir a un gen estructural para perjudicar o mejorar la actividad de una actividad enzimática, o se puede dirigir a un gen regulador, incluyendo regiones promotoras y sitios de unión al ribosoma, de modo que se module el nivel de expresión de una actividad enzimática.

De este modo se contempla que las transformaciones y las mutaciones se pueden combinar de modo que controlen actividades enzimáticas concretas para la mejora de la producción de 1,3-propanodiol. De este modo, está dentro del alcance de la presente invención el anticipar modificaciones de un catalizador de la célula completa que conducen a una producción incrementada de 1,3-propanodiol.

La presente invención utiliza una ruta preferida para la producción de 1,3-propanodiol a partir de un sustrato de azúcar en donde el flujo de carbono se traslada desde glucosa a DHAP, G3P, glicerol, 3-HPA, y finalmente a 1,3-propanodiol. Las presentes cepas de producción se han manipulado genéticamente para maximizar la eficacia metabólica de la ruta, incorporando diferentes mutaciones por delección que evitan la desviación del carbono a compuestos no productivos. El glicerol se puede desviar de la conversión a 3HPA mediante la transformación a DHA o a G3P, a través de la deshidrogenasa de glicerol o la cinasa de glicerol, tal y como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, las presentes cepas de producción contienen mutaciones por delección en los genes *gldA* y *glpK*. De forma similar, DHAP se puede desviar a 3-PG a través de una isomerasa de triosafosfato, de este modo el presente microorganismo de producción también contiene una mutación por delección en este gen. El método presente incor-

para además una enzima deshidratasa para la conversión de glicerol a 3HPA, que actúa de acuerdo con el factor de reactivación, codificado por *orfX* y *orfZ* del regulón *dha*. Aunque la conversión de la 3HPA a 1,3-propanodiol se consigue típicamente a través de una oxidoreductasa de 1,3-propanodiol, el método presente utiliza una actividad catalítica inespecífica que produce títulos y rendimientos más elevados del producto final, 1,3-propanodiol. En tal procedimiento, se consiguen títulos de 1,3-propanodiol de al menos 10 g/l, en donde se esperaban títulos de 200 g/l.

Alternativamente, un procedimiento mejorado para la producción de 1,3-propanodiol puede utilizar glicerol o dihidroxiacetona como sustrato cuando la ruta comprende solamente los tres últimos sustratos, glicerol → 3HPA → 1,3-propanodiol. En tal procedimiento, la oxidoreductasa se elimina de nuevo a favor de la actividad catalítica inespecífica (que se espera que sea una deshidrogenasa de alcohol), no obstante, la necesidad de mutaciones por delección se anulan por las consideraciones energéticas de añadir glicerol al cultivo. En dicho procedimiento, se alcanzan títulos de 1,3-propanodiol de por lo menos 71 g/l, en donde se esperaban títulos de 200 g/l.

De forma similar, está dentro del alcance de la invención proporcionar mutantes de microorganismos de tipo silvestre que se han modificado por delección o mutación de la actividad de *dhaT*, para crear productores mejorados de 1,3-propanodiol. Por ejemplo, microorganismos, que contienen de forma natural todos los elementos del regulón *dha*, se pueden manipular de modo que se inactive el gen *dhaT* que codifica la actividad oxidoreductasa de 1,3-propanodiol. Se espera que estos microorganismos produzcan rendimientos y títulos más elevados de 1,3-propanodiol, mediados por la presencia de una actividad catalítica endógena, que se espera que sea una deshidrogenasa de alcohol. Ejemplos de tales microorganismos incluyen, pero no están limitados a los mismos, *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp. y *Clostridium* sp.

Medios y sustratos del carbono

Los medios de fermentación en la presente invención deben contener sustratos adecuados de carbono. Los sustratos adecuados pueden incluir, pero no están limitados a los mismos, monosacáridos tales como glucosa y fructosa, y oligosacáridos tales como lactosa o sacarosa.

En la presente invención, el sustrato de carbono preferido es glucosa.

Además de una fuente de carbono apropiada, los medios de fermentación deben contener minerales, sales, cofactores, tampones y otros componentes adecuados, conocidos por los expertos en la materia, adecuados para el crecimiento de los cultivos y el impulso de la ruta enzimática necesaria para la producción de 1,3-propanodiol. Se otorga una particular atención a las sales de Co(II) y/o a la vitamina B₁₂ o a sus precursores.

La adenosil-cobalamina (coenzima B₁₂) es un cofactor esencial para la actividad deshidratasa. La síntesis de coenzima B₁₂ se encuentra en procariotas, algunos de los cuales son capaces de sintetizar el compuesto de nuevo, por ejemplo, *Escherichia blattae*, especies de *Klebsiella*, especies de *Citrobacter* y especies de *Clostridium*, mientras que otros pueden realizar reacciones parciales. *E. coli*, por ejemplo, no puede producir la estructura del anillo de corrina, pero es capaz de catalizar la conversión de cobinamida a corrinoide y puede introducir el grupo 5'-desoxiadenosilo. Por tanto, se conoce en la técnica que un precursor de la coenzima B₁₂, tal como la vitamina B₁₂, se tiene que proporcionar en las fermentaciones con *E. coli*.

Las adiciones de vitamina B₁₂ a las fermentaciones de *E. coli* se pueden añadir continuamente, con un régimen constante o escalonado, de forma que coincida con la generación de la masa celular, o se puede añadir en adiciones aisladas o múltiples de bolos. Las relaciones preferidas de vitamina B₁₂ (mg) alimentada a la masa celular (DO₅₅₀) son desde 0,06 hasta 0,60. Las relaciones más preferidas de vitamina B₁₂ (mg) alimentada a la masa celular (DO₅₅₀) son desde 0,12 hasta 0,48.

Aunque la vitamina B₁₂ se añade a *E. coli* transformada de la presente invención, se contempla que otros microorganismos, capaces de la biosíntesis de nuevo de B₁₂ también serán células productoras adecuadas y la adición de B₁₂ a estos microorganismos será innecesaria.

Condiciones del cultivo:

Típicamente, las células se hacen crecer a 35°C en medios apropiados. Los medios de crecimiento preferidos en la presente invención son medios comunes preparados de forma comercial, tales como el caldo de Luria Bertani (LB), caldo de dextrosa de Sabouraud (SD) o caldo de medio de levadura (YM). Otros medios de crecimiento definidos o sintéticos también se pueden utilizar y el medio apropiado para el crecimiento del microorganismo particular será conocido por algún especialista en la materia de ciencias microbiológicas o de fermentación. El uso de agentes conocidos para modular la represión del catabolito directa o indirectamente, p. ej., adenosina 2':3'-monofosfato cíclica, también se puede incorporar en los medios de reacción. De forma similar, el uso de agentes conocidos para modular actividades enzimáticas (p. ej., el viologeno de metilo) que conducen a una mejora de la producción de 1,3-propanodiol, se puede utilizar junto con o como alternativa a las manipulaciones genéticas.

Intervalos adecuados de pH para la fermentación están entre pH 5,0 y pH 9,0, en donde se prefiere el pH de 6,0 a pH 8,0 como estado inicial.

Las reacciones se pueden realizar bajo condiciones aerobias o anaerobias, en donde se prefieren las condiciones aerobias, anóxicas o anaerobias, basándose en los requisitos del microorganismo.

Las fermentaciones semicontinuas se pueden realizar con alimentación de carbono, por ejemplo, glucosa, limitada o en exceso.

Fermentaciones por lotes y continuas:

El presente procedimiento emplea un método de fermentación por lotes. La fermentación clásica por lotes es un sistema cerrado en donde la composición del medio se determina al comienzo de la fermentación y no está sujeta a alteraciones artificiales durante la fermentación. Así, al comienzo de la fermentación, el medio se inocula con el microorganismo o los microorganismos deseados y se deja que tenga lugar la fermentación sin añadir nada al sistema. Típicamente, sin embargo, la fermentación "por lotes" es por lotes con respecto a la adición de la fuente de carbono y se han realizado frecuentemente intentos con factores de control, tales como el pH y la concentración de oxígeno. En los sistemas por lotes, las composiciones del metabolito y de la biomasa del sistema cambian constantemente, hasta el momento en el que se detiene la fermentación. En los cultivos por lotes, las células están moderadas a través de una fase logarítmica estática hasta una fase logarítmica elevada del crecimiento y finalmente una fase estacionaria, en donde la tasa de crecimiento disminuye o está detenida. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria eventualmente morirán. Las células en la fase logarítmica son generalmente responsables del volumen de producción del producto final o intermedio.

Una variación en el sistema por lotes convencional es el sistema semicontinuo. Los procesos de fermentación semicontinuos también son adecuados en la presente invención y comprenden un sistema típico por lotes, con la excepción de que el sustrato se añade en incrementos a medida que va progresando la fermentación. Los sistemas semicontinuos son útiles cuando la represión del catabolito es adecuada para inhibir el metabolismo de las células y cuando es deseable tener unas cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medición de la concentración de sustrato real en los sistemas semicontinuos es difícil y, por lo tanto, se estima en base a los cambios de factores medibles, tales como pH, oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales tales como CO₂. Las fermentaciones por lotes y semicontinuas son comunes y bien conocidas en la técnica y se pueden encontrar ejemplos en Brock, *supra*.

Aunque la presente invención se realiza por lotes, se contempla que el método podría adaptarse a métodos de fermentación continua. La fermentación continua es un sistema abierto, en donde un medio de fermentación definido se añade continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medio condicionado se elimina simultáneamente para el procesamiento. La fermentación continua mantiene generalmente los cultivos a una densidad alta constante, en donde las células están sobre todo en crecimiento de fase logarítmica.

La fermentación continua permite la modulación de un factor o de cualquier número de factores que afectan al crecimiento celular o a la concentración del producto final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante, tal como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno, con una tasa fija y permitirá moderar todos los demás parámetros. En otros sistemas, un número de factores que afectan al crecimiento se pueden alterar continuamente, mientras que la concentración celular, medida por la turbidez del medio, se mantiene constante. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener unas condiciones de crecimiento en estado estacionario y así la pérdida de células debida a que el medio se tiene que retirar, se puede equilibrar frente a la tasa de crecimiento celular en la fermentación. Métodos para modular los nutrientes y factores de crecimiento para procesos de fermentación continua, así como técnicas para maximizar la tasa de formación del producto, son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial y una variedad de métodos se detalla en Brock, *supra*.

Se contempla que la presente invención se puede poner en práctica empleando procesos de alimentación por lotes, semicontinuos o continuos y que cualquier modo de fermentación conocido sería adecuado. Además, se contempla que las células pueden estar inmovilizadas sobre un sustrato como catalizadores celulares completos y sometidas a las condiciones de fermentación para la producción de 1,3-propanodiol.

Identificación y purificación de 1,3-propanodiol:

Métodos para la purificación de 1,3-propanodiol a partir de los medios de fermentación son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los propanodiolos se pueden obtener a partir de medios celulares, sometiendo la mezcla de reacción a extracción con un disolvente orgánico, destilación y cromatografía en columna (documento de patente de EE.UU. 5.356.812). Un disolvente orgánico particularmente bueno para este procedimiento es el ciclohexano (documento de patente de EE.UU. 5.008.473).

El 1,3-propanodiol se puede identificar directamente sometiendo el medio a un análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En la presente invención se prefiere un método en donde el medio de fermentación se analiza sobre una columna de intercambio iónico analítica, usando una fase móvil de ácido sulfúrico 0,01 N de manera isocrática.

MÉTODOS GENERALES Y MATERIALES

Los procedimientos para las fosforilaciones, ligaciones y transformaciones son bien conocidos en la técnica. Técnicas adecuadas para el uso en los ejemplos siguientes, se pueden encontrar en Sambrook, J. y otros, *supra*.

Los materiales y los métodos adecuados para el mantenimiento y el crecimiento de los cultivos bacterianos

son bien conocidos en la técnica. Las técnicas adecuadas para uso en los siguientes ejemplos, se pueden encontrar en "Manual of Methods for General Bacteriology" (Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Philips, compiladores), American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1994) o Thomas D. Brock en "Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology", segunda edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. Todos los reactivos y los materiales utilizados para el crecimiento y el mantenimiento de las células bacterianas, se obtuvieron a partir de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) o Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), salvo especificación de lo contrario.

El significado de las abreviaturas es del modo siguiente: "h" significa hora(s), "min" significa minuto(s), "s" significa segundo(s), "d" significa día(s), "mL" significa mililitros, "L" significa litros, 50 amp es 50 µg/mL de ampicilina y LB-50 amp es caldo de Luria-Bertani que contiene 50 µg/ml de ampicilina.

En las tablas se utilizan las siguientes abreviaturas. "Con." es conversión, "Sel." es selectividad basada en carbono y "nd" es no detectado.

Las cepas y los vectores utilizados y construidos en los siguientes ejemplos, se enumeran en el diagrama a continuación:

Nombre	Nombre alternativo	Fenotipo
FM5		
RJF 10		FM5 glpK-
KLP23 WO2001012833 A2		FM5 glpK- gldA-
KLndh81		FM5 glpK- gldA- ndh-
KLpts7		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR
KgalP-trc		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc
KLGG		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glpK-trc
KLGGAarcA		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glpK-trc arcA-
KLGG AarcA Δedd	FMP	FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glpK-trc arcA- edd-
FMP seleccionada	FMP'::Km	FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glpK-trc* arcA- edd-
FMP'::Km 1.5gapA		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glpK-trc* arcA- edd- gapAp-1.5
FMP' 1.5 gapA		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glpK-trc* arcA- edd- gapAp-1.5
FMP' 1.5 gapA		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc
ΔmgsA		glpK-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA-
FMP' 1.5 gap Δmgs	Triple	FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc
1.6ppc		glpK-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6
Triple 1.6 btuR		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glpK-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6
Triple 1.6 btuR 1.6yqhD		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glpK-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC- yqhDp-1.6
Triple 1.6 btuR 1.6yqhD ΔackA-pta	Triple Triple	FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glpK-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC- yqhDp-1.6 ackA-pta-
Triple Triple ΔaldA		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glpK-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC- yqhDp-1.6 ackA-pta- aldA-
Triple Triple ΔaldB		FM5 glpK- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glpK-trc* arcA- edd- gapAp-1.5

Nombre	Nombre alternativo	Fenotipo
		mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC- yqhDp-1.6 ackA-pta- aldB-
Triple Triple Δ aldA Δ aldB		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC- yqhDp-1.6 ackA-pta- aldA- aldB-

Cepas:

KLP23 (WO 2001012833 A2),

RJ8.n (ATCC PTA-4216),

5 MG 1655 ATCC 700926 (disponible comercialmente)

Plásmidos:

pAH48 WO 9821340 A1

pDT29 WO 2001012833 A2

pKP32 WO 2001012833 A2

10 pSYCO101 SEQ ID NO:65

pSYCO103 SEQ ID NO:66

pSYCO106 SEQ ID NO:67

pSYCO109 SEQ ID NO:68.

15 Los plásmidos pKD3, pKD4, pKD13 y pKD46 y pCP20 han sido descritos (Datsenko y Wanner, *supra*). Los plásmidos pLoxCat2 y pJW168 han sido descritos (Palmeros y otros, *supra*).

Integración cromosómica para inactivar genes, sustituir promotores e introducir mutaciones cromosómicas.

20 Para integrar un ADN en una región específica del cromosoma, es necesaria una homología del ADN que se va a insertar con el sitio cromosómico diana y un marcador seleccionable. Es ventajoso si el marcador se puede eliminar fácilmente después de la integración. El sistema de recombinasa *loxP*/Cre procedente del fago P1 y el sistema de recombinasa FRT/Flp procedente de la levadura, proporcionan un mecanismo para eliminar el marcador. Los sitios *loxP* y FRT son sitios de reconocimiento para las recombinasas Cre y Flp. Cre y Flp son recombinasas específicas del sitio, que escinden el ADN intercalado de los sitios de reconocimiento directamente repetidos.

25 El casete de integración que contiene los brazos homólogos del sitio cromosómico diana y que codifica un marcador seleccionable flanqueado por los sitios *loxP* [Palmeros y otros. Gene 247, 255-264 (2000)] o FRT [Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6640-6645 (2000)] se transforma en las células diana que cobijan pKD46 (Datsenko y Wanner, *supra*). Las estructuras integradas con éxito se seleccionan, haciendo crecer las células en presencia del antibiótico. Posteriormente, pKD46 se obtiene a partir de las células y los plásmidos de recombinasa se introducen a continuación en las estructuras integradas para eliminar el gen del antibiótico. Las cepas integradas con un casete *loxP* se transforman con pJW 168 que codifica una recombinasa Cre (Palmeros y otros, *supra*). Las cepas que contienen un casete FRT se transforman con pCP20 que codifica una recombinasa Flp (Datsenko y Wanner, *supra*). Después de la eliminación del marcador integrado, los plásmidos de la recombinasa se obtienen a partir de la cepa.

35 La transducción de *vir* de P1 se realizó tal y como se ha descrito previamente [Miller, J. H. , "A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria". (1992) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY].

ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Ensayos para la actividad glucocinasa (Glc)

40 La actividad glucocinasa (Glc) se sometió a ensayo siguiendo la conversión de glucosa a glucose-6-fosfato espectrofotométricamente a 340 nm, mediante el acoplamiento de la *reacción* de glucocinasa con la de la deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (E.C. 1.1.1.49). El ensayo contenía NADP 0,5 mM, ATP 5 mM, MgCl₂ 5 mM y 2 unidades de deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato en tampón fosfato 100 mM, pH 7,2. Ensayos alternativos se pueden encontrar en T. E. Barman, "Enzyme Handbook" (1985), Springer-Verlag, Berlín.

Ensayo para la actividad deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato:

El ensayo para la actividad deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato se midió en extractos sin células por la aparición de NADH. Un material sobrenadante sin células ultracentrifugado (50.000 x g, 1 h, 4°C) se purificó parcialmente usando una columna de intercambio iónico antes de ensayo. El ensayo contenía gliceraldehído-3-fosfato 0,2 mM, NAD⁺ 2,5 mM, EDTA 2 mM, cisteamina 5 mM, fosfato potásico 20 mM y trietanolamina 40 mM, a pH 8,9. Ensayos alternativos se pueden encontrar en T. E. Barman, *supra*.

Ensayo para la actividad carboxilasa de fosfoenolpiruvato (Ppc):

La actividad carboxilasa de fosfoenolpiruvato (Ppc) fue medida en extractos sin células mediante un ensayo acoplado (Flores y Gancedo, FEBS Lett. 412, 531-534 (1997)). Este método implica incubar a temperatura ambiente una muestra de extracto sin células, ultracentrifugada (50.000 x g, 1 h, 4°C) en una cubeta que contenía NADH 22 mM, fosfoenolpiruvato 1,1 mM (PEP), acetil-CoA 0,25 mM, y 6 U de deshidrogenasa de malato (MDH) en tampón Tris/HCl 0,1 M, pH 8,5, con bicarbonato sódico 11 mM y sulfato de magnesio 11 mM, en un volumen total de 1,0 mL. Una tasa basal de la reacción de la enzima y el NADH se determinó en primer lugar a 340 nm en ausencia de PEP. El segundo sustrato, PEP, fue añadido posteriormente y el cambio de la absorbancia a lo largo del tiempo se vigiló adicionalmente. La actividad Ppc se definió restando la tasa basal de la tasa bruta. Ensayos alternativos se pueden encontrar en T. E. Barman, *supra*.

Ensayos para enzimas deshidratasas:

La actividad deshidratasa en extractos sin células se determinó usando glicerol o 1,2-propanodiol como sustrato. Típicamente, los extractos sin células se prepararon mediante alteración de la célula, usando una prensa francesa seguido de centrifugación del residuo celular. El ensayo, basado en la reacción de los aldehídos con metilbenzo-2-tiazolona hidrazona, se ha descrito por Forage y Foster (Biochim. Biophys. Acta 569, 249 (1979)).

Honda y otros (J. Bacteriol. 143, 1458 (1980)) describen un ensayo que mide la reactivación de las deshidratasas. La actividad deshidratasa se determinó en células completas toluenizadas, con y sin ATP, usando glicerol o 1,2-propanodiol como sustrato. La reactivación se determinó por la relación de la formación de producto frente a la adición o no de ATP. La formación de producto (3-HPA o propionaldehído cuando se emplea como sustrato glicerol o 1,2-propanodiol, respectivamente) se midió directamente, usando HPLC, o indirectamente usando el reactivo metilbenzo-2-tiazolona hidrazona. Alternativamente, la formación de producto se determinó acoplando la conversión del aldehído a su alcohol respectivo, usando una deshidrogenasa de alcohol ligada a NADH y vigilando la desaparición de NADH.

Ensayos para la oxidorreductasa de 1,3-propanodiol:

La actividad oxidorreductasa de 1,3-propanodiol, denominada a veces deshidrogenasa de 1,3-propanodiol, fue determinada para extractos sin células en solución o en geles planos usando 1,3-propanodiol y NAD⁺ como sustratos, ha sido descrita (Johnson y Lin, J. Bacteriol. 169, 2050 (1987)). Alternativamente, la conversión de 3-HPA y NADH a 1,3-propanodiol y NAD⁺ fue determinada por la desaparición de NADH. El ensayo de gel plano tiene la ventaja potencial de separar la actividad de la oxidorreductasa de 1,3-propanodiol (*dhaT*) de la de las deshidrogenasas de alcohol no específicas, en virtud de la separación por tamaños. Los pesos moleculares naturales de las oxidorreductasas de 1,3-propanodiol (*dhaT*) procedentes de *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Clostridium pasteurianum* son inusualmente elevados, en el orden de 330.000 a 440.000 dalton. *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus buchneri* contienen una deshidratasa asociada a las oxidorreductasas de 1,3-propanodiol con propiedades similares a las de las oxidorreductasas de 1,3-propanodiol (*dhaT*) conocidas.

Ensayos de la actividad deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato:

Se utilizó un procedimiento tal y como se modifica más abajo a partir de un método publicado por Bell y otros. (J. Biol. Chem. 250, 7153 (1975)). Este método implicaba incubar una muestra de extracto sin células en una cubeta que contenía NADH 0,2 mM, fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) 2,0 mM y enzima en tampón Tris/HCl 0,1 M, pH 7,5 con DTT 5 mM, en un volumen total de 1,0 mL a 30°C. Una tasa basal de la reacción de la enzima y del NADH se determinó en primer lugar a 340 nm durante al menos 3 min. El segundo sustrato, DHAP, se añadió posteriormente y el cambio de la absorbancia a lo largo del tiempo se vigiló adicionalmente durante al menos 3 min. La actividad G3PDH se definió restando la tasa basal de la tasa bruta.

Ensayo de la actividad glicerol-3-fosfatasa:

El ensayo de la actividad enzimática se realizó incubando el extracto con un sustrato de fosfato orgánico en un tampón bis-Tris o MES y magnesio, pH 6,5. El sustrato utilizado era fosfato de l- α -glicerol o fosfato de d,l- α -glicerol. Las concentraciones finales de los reactivos en el ensayo son: tampón (bis-Tris 20 mM o MES 50 mM); MgCl₂ (10 mM); y sustrato (20 mM). Si la proteína total en la muestra era baja y no tenía lugar una precipitación visible con un enfriamiento rápido con ácido, la muestra se sometió a ensayo convenientemente en la cubeta. Este método implicaba incubar una muestra de la enzima en una cubeta que contenía sustrato 20 mM (50 μ L, 200 mM), tampón MES 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 6,5. El volumen final del ensayo de la fosfatasa era 0,5 mL. La muestra que contenía la enzima se añadió a la mezcla de reacción; el contenido de la cubeta se mezcló y a continuación se co-

locó la cubeta en un baño con agua circulante a $T = 37^{\circ}\text{C}$ durante 5 a 120 min, dependiendo el período de tiempo de si la actividad fosfatasa en la muestra de la enzima estaba en el intervalo de 2 a 0,02 U/mL. La reacción enzimática se enfrió rápidamente por la adición del reactivo molibdato ácido (0,4 ml). Después de añadir el reactivo Fiske SubbaRow (0,1 mL) y agua destilada (1,5 ml), la solución se mezcló y se permitió el revelado. Después de 10 min, para permitir el revelado completo del color, se leyó la absorbancia de las muestras a 660 nm usando un espectrofotómetro Cary 219 UV/vis. La cantidad de fosfato inorgánico liberado se comparó con una curva patrón que se había preparado usando una solución madre de fosfato inorgánico (0,65 mM) y preparando 6 patrones con concentraciones finales de fosfato inorgánico en el intervalo de 0,026 a 0,130 $\mu\text{mol/mL}$.

Ensayo de la actividad cinasa de glicerol:

Una cantidad apropiada de enzima, típicamente un extracto bruto sin células, se añadió a una mezcla de reacción que contenía ATP 40 mM, MgSO_4 20 mM, glicerol 21 mM marcado uniformemente con ^{13}C (99%, Cambridge Isotope Laboratories) y Tris-HCl 0,1 M, pH 9, durante 75 min a 25°C . La conversión de glicerol a glicerol-3-fosfato se detectó por ^{13}C -RMN (125 MHz): glicerol (63,11 ppm, δ , $J = 41$ Hz y 72,66 ppm, t, $J = 41$ Hz); glicerol-3-fosfato (62,93 ppm, 5, $J = 41$ Hz; 65,31 ppm, br d, $J = 43$ Hz; y 72,66 ppm, dt, $J = 6,41$ Hz).

Ensayo de la deshidrogenasa de glicerol ligada a NADH:

La actividad deshidrogenasa de glicerol (*gldA*) ligada a NADH en extractos sin células de cepas de *E. coli*, se determinó después de la separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturante. La conversión de glicerol más NAD^+ en dihidroxiacetona más NADH estaba acoplada a la conversión de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en un formazano intensamente coloreado, usando meto-

sulfato de fenazina (PMS) como mediador (Tang y otros, J. Bacteriol. 140, 182 (1997)).

La electroforesis se realizó por duplicado mediante procedimientos convencionales, usando geles naturales (8-16% de TG, 1,5 mm, geles con 15 pistas de Novex, San Diego, CA). El glicerol residual se eliminó de los geles lavando 3x con tampón Tris o carbonato potásico 50 mM, pH 9 durante 10 min. Los geles por duplicado se revelaron, con y sin glicerol (concentración final de aproximadamente 0,16 M), en 15 mL de solución del ensayo que contenía Tris o carbonato potásico 50 mM, pH 9, 60 mg de sulfato de amonio, 75 mg de NAD^+ , 1,5 mg de MTT y 0,5 mg de PMS.

La presencia o la ausencia de la actividad deshidrogenasa de glicerol ligada a NADH en las cepas de *E. coli* (*gldA*), también se determinó, después de una electroforesis en gel de poliacrilamida, mediante reacción con anticuerpos policlonales obtenidos contra la deshidrogenasa de glicerol de *K. pneumoniae* (*dhaD*) purificada.

Aislamiento e identificación de 1,3-propanodiol:

Análisis con HPLC de los productos de fermentación. La conversión de glucosa en 1,3-propanodiol se controló mediante HPLC. Los análisis se realizaron usando cromatografía convencional. Un método adecuado utilizaba un sistema de HPLC de Waters Alliance, usando detección de RI. Las muestras se inyectaron sobre una columna Aminex HPX87H (7,8 mm x 300 mm, Biorad, Hercules, CA) equipada con una precolumna de cartucho de recarga de catión H (4,6 mm x 30 mm, Biorad, Hercules, CA), temperatura controlada a 50°C , usando H_2SO_4 5 mM como fase móvil con un caudal de 0,4 mL/min. El sistema era se calibró semanalmente frente a patrones de concentración conocida. Típicamente, los tiempos de retención de la glucosa, glicerol, 1,3-propanodiol y ácido acético eran de 12,7 min, 19,0 min, 25,2 min y 21,5 min, respectivamente.

Análisis GC/MS de los métodos de la fermentación.

La producción de 1,3-propanodiol se confirmó con GC/MS. Los análisis se realizaron usando técnicas convencionales y materiales disponibles a una persona especialista en la técnica de GC/MS. Un método adecuado utilizaba un cromatógrafo de gases de la serie II 5890 de Hewlett-Packard, acoplado a un detector selectivo de la masa de la serie 5971 de Hewlett-Packard (EI) y una columna HP-INNOWax (longitud 30 m, i. d. 0,25 mm, espesor de la película 0,25 micras). El tiempo de retención y el espectro de masas de 1,3-propanodiol generado se comparó con el del 1,3-propanodiol auténtico (m/e: 57, 58).

Un método alternativo para GC/MS, implicaba la derivatización de la muestra. A 1,0 mL de la muestra (p. ej., material sobrenadante del cultivo) se añadieron 30 μL de ácido perclórico concentrado (70% v/v). Después de mezclar, la muestra se congeló y se liofilizó. Una mezcla 1:1 de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida:piridina (300 μL) se añadió al material liofilizado, se mezcló vigorosamente y se colocó a 65°C durante una h. La muestra se clarificó del material insoluble por centrifugación. El líquido resultante se dividió en dos fases, la superior se utilizó para el análisis. La muestra se cromatografió sobre una columna DB-5 (48 m, I.D. 0,25 mm, 0,25 μm de espesor de la película; procedente de J&W Scientific) y el tiempo de retención y el espectro de masas del derivado de 1,3-propanodiol obtenido a partir del material sobrenadante del cultivo, se comparó con el obtenido a partir de los patrones auténticos. El espectro de masas de 1,3-propanodiol derivatizado con TMS contiene los iones característicos de 205, 177, 130 y 115 AMU.

Composición del medio

El medio TM2 (TM2) es una receta base a la cual se añade la fuente de carbono (típicamente glucosa, a 20

g/L o 40 g/L), antibióticos apropiados y otros componentes. El medio TM2 contiene los siguientes componentes: K_2HPO_4 (13,6 g/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 g/l), ácido cítrico monohidrato (2 g/l), citrato férrico de amonio (0,3 g/l), $(NH_4)_2SO_4$ (3,2 g/l), extracto de levadura (5 g/l), solución de oligoelementos (1 ml). El pH se ajusta a 6,8. La solución de oligoelementos contiene: ácido cítrico H_2O (4,0 g/l), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (3,0 g/l), NaCl (1,0 g/l), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,10 g/l), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,10 g/l), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,10 g/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,010 g/l), H_3BO_3 (0,010 g/l) y $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,010 g/l).

El medio TM3 (TM3) es idéntico al medio TM2, salvo que contiene 0,5 g/L de extracto de levadura.

El medio LB (LB) contiene 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona y 10 g/L de NaCl. Las placas LB (o LA) son medio LB + 2% de agar. El medio 2YT (2YT) contiene 10 g/L de extracto de levadura, 16 g/L de triptona y 10 g/L de NaCl. El caldo de soja con glucosa (SBG1%) contiene 10 g/L de Soytone (Difco), 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl y 10 g/L de glucosa.

Protocolo de la fermentación (14L)

Cultivos en matraz de agitación de todas las cepas descritas (KLP23, RJ8.n, MB 1655) se hicieron crecer sobre medio 2YT o LB que contenía los antibióticos apropiados, tal y como se detalla en los ejemplos, para preparar el precultivo para la inoculación de los fermentadores. Los cultivos se iniciaron a partir de viales de siembra congelados, preparados con glicerol al 15% como crioprotector o a partir de una colonia individual hecha crecer sobre placas LA de nuevo aporte, con 50 mg/L de espectinomicina. Los cultivos iniciados a partir de un vial congelado, se dejaron crecer en 500 mL del medio especificado en un matraz de 2 L; cuando se utilizaba una colonia individual para iniciar el precultivo, esta se colocó en 30 mL del medio especificado en un matraz con placas deflectoras de 250 mL. Los cultivos se incubaron a 34°C y 300 rpm, agitando hasta obtener una DO_{550} de aproximadamente 1,0 UA y se utilizaron para sembrar el fermentador. En algunos casos, se empleó un fermentador de siembra para proporcionar un precultivo mayor para la inoculación de un fermentador de producción. Los fermentadores de siembra eran generalmente idénticos a los fermentadores de producción, excepto que no se añadía vitamina B_{12} al tanque de siembra. Detalles sobre los procedimientos para usar los fermentadores de siembra se describen en los ejemplos pertinentes.

Los fermentadores de siembra y de producción se prepararon con el mismo medio, que contenía KH_2PO_4 (7,5 g/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 g/l), ácido cítrico monohidrato (2 g/l), citrato férrico de amonio (0,3 g/l), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,2 g/l), ácido sulfúrico (98%; 1,2 ml/l), Mazu DF204 (0,4 ml/l) como antiespumante, extracto de levadura (5 g/l), solución de oligoelementos (10 ml/l). La solución de oligoelementos contenía: ácido cítrico H_2O (4,0 g/l), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (3,0 g/l), NaCl (1,0 g/l), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,10 g/l), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,10 g/l), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,10 g/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,010 g/l), H_3BO_3 (0,010 g/l), y $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,010 g/l). Después de la esterilización, el pH se ajustó a 6,8 con 20-28% de NH_4OH y se realizaron adiciones de glucosa (hasta 10-25 g/L a partir de una solución al 60-67% (p/p)) y los antibióticos apropiados (véanse los ejemplos específicos para más detalles). El volumen del fermentador después de la inoculación era de 6 litros.

Un fermentador de tanque agitado de 14 L se preparó con el medio descrito anteriormente. La temperatura se controló a 34°C y se empleó amoníaco acuoso (20-28% en peso) para controlar el pH a 6,8. La contrapresión se controló a 0,5 bares relativos y el control dO se estableció en el 5%. A excepción de pequeñas oscilaciones, la concentración de glucosa se mantuvo entre 0 g/L y 25 g/L con una alimentación del 60-67% (p/p). Las adiciones de vitamina B_{12} y cualquier otro cambio en el proceder general descrito en esta memoria, se apuntan en los ejemplos.

El rendimiento molar, como una fracción o %, representa (mol de glicerol producido + mol de 1,3-propanodiol producido)/(mol de glucosa consumida). El rendimiento en peso, dado generalmente como %, representa (g de 1,3-propanodiol producido)/(g de glucosa consumida).

EJEMPLO 1

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *E. COLI* DE TIPO DESHIDROGENASA DE NADH II NEGATIVAS (*Δndh*), PARA LA PRODUCCIÓN DE 1,3-PROPANODIOL

Construcción de KLnd81

Una mutación *ndh* fue obtenida interrumpiendo la región codificadora con un casete *loxP511*. El gen *ndh* (para la referencia, véase GenBank, nº de orden U00096), con regiones flanqueantes aguas arriba y aguas abajo, se amplificó con la PCR a partir de MG1655 de *E. coli* y se clonó. El casete *ndh* fue digerido con *Stu* I, que cortaba aproximadamente en el medio del gen, y un casete *loxP511-Cat-loxP511* se clonó en este sitio con el gen cat en la orientación opuesta en relación con el gen *ndh*. El casete *loxP511-Cat-loxP511* se obtuvo a partir del plásmido pLoxCat27 [SEQ ID NO:1] mediante la digestión con *Spe* I y *Eco*R V, seguido por el relleno para generar extremos romos, y la purificación en gel del fragmento de 1,1 kb. El sitio *loxP511* es una variante del sitio del *loxP* (Palmeros y otros, *supra*). El casete *ndh::Cat* se amplificó con la PCR y se electroporó en células competentes KLP23 creando la cepa KLndh81::Cm. El marcador de cloranfenicol se eliminó con la recombinasa Cre (Palmeros y otros, *supra*) dejando 96 pb de secuencia interrumpida que contenía un sitio *loxP511*. Esta cepa se denominó KLndh81. Alternativamente, se obtuvo una mutación *ndh* interrumpiendo la región codificadora con un casete Cat sin los sitios *loxP*, para proporcionar la cepa KLNDH413.

Construcción de RJ8.n.

Un casete que contenía la secuencia flanqueante *ndh* y *loxP511*-Cat-*loxP511* procedente de KLn_{dh}81::Cm, se amplificó con la PCR y se clonó en pUni/V5-His TOPO [Invitrogen] para crear pAH111. El casete *ndh*-*loxP511*-Cat-*loxP511* procedente de pAH111 se integró en la cepa RJ8/pKD46. Las cepas recombinantes se seleccionaron por la resistencia al cloranfenicol. La integración con éxito del casete en *ndh* fue confirmada por PCR. El marcador de cloranfenicol se eliminó empleando la recombinasa Cre (Palmeros y otros, *supra*) creando la cepa RJ8.n.

EJEMPLO 2COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE 1,3-PROPANODIOL Y GLICEROL CON CEPAS DE *E. COLI* KLP23/pAH48/pDT29 Y KLP23/pAH48/pKP32

La cepa KLP23 se transformó con los plásmidos pAH48 y pDT29 o pKP32. La producción de 1,3-propanodiol (y glicerol) se determinó en fermentadores de 14 L, tal y como se ha descrito en los Métodos Generales. Se prepararon precultivos para cada fermentación usando viales congelados, descongelados y que crecieron en 500 mL de 2YT con 200 mg/L de carbenicilina y 50 mg/L de espectinomicina. El contenido total del matraz se utilizó para inocular el fermentador. El fermentador funcionaba a 35°C y un punto de ajuste d6 del 10%; todos los demás parámetros de control son tal y como se han descrito en los Métodos Generales. La estrategia de la vitamina B₁₂ para cada fermentación se detalla más abajo.

Fermentación con KLP23/pAH48/pDT29.

En este ejemplo, se suministró vitamina B₁₂ (0,075 g/l, 500 ml), empezando 3 h después de la inoculación, a una velocidad de 16 mL/h. Un resumen representativo de la fermentación, de la conversión de glucosa en 1,3-propanodiol (1,3-PD) empleando la cepa de *E. coli* KLP23/pAH48/pDT29 se proporciona en la Tabla 2.1. El rendimiento en 1,3-propanodiol era del 24% en peso (g de 1,3-propanodiol/g de glucosa consumida) y se obtuvo un título de 68 g/L de 1,3-propanodiol.

TABLA 2.1

Sumario de la fermentación representativa, de la conversión de glucosa en 1,3-propanodiol (1,3-PD) empleando la cepa de *E. coli* KLP23/pAH48/pDT29S

Tiempo (h)	DO ₅₅₀ (UA)	OD (%)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	150	12,9	0,0	0
6	17	80	8,3	3,1	1
12	42	53	2,8	12,5	9
18	98	9	5,7	12,6	32
24	136	11	32,8	12,0	51
30	148	10	12,3	13,3	62
32	152	11	12,5	14,3	65
38	159	11	1,5	17,2	68

Se obtuvieron resultados similares con una alimentación idéntica de vitamina B₁₂ multiplicando por dos la concentración o por adiciones de bolos de vitamina B₁₂ a lo largo del transcurso de la fermentación. El título obtenido más elevado era 77 g/l.

Fermentación mejorada con KLP23/pAH48/pKP32.

Un resumen representativo de la fermentación, de la conversión de glucosa en 1,3-propanodiol (1,3-PD) empleando la cepa de *E. coli* KLP23/pAH48/pKP32, se proporciona en la Tabla 2.2. Se suministró vitamina B₁₂ (0,150 g/l, 500 ml), empezando 3 h después de la inoculación, a una velocidad de 16 mL/h. Después de 36 h, se purgaron aproximadamente 2 L de caldo de fermentación para permitir la adición continuada del suministro de glucosa. El rendimiento en 1,3-propanodiol era del 26% en peso (g de 1,3-propanodiol/g de glucosa consumida) y se obtuvo un título de 112 g/L de 1,3-propanodiol.

TABLA 2.2

Sumario de la fermentación representativa, de la conversión mejorada de glucosa en 1,3-propanodiol (1,3-PD) empleando la cepa de *E. coli* KLP23/pAH48/pKP32

Tiempo (h)	DO ₅₅₀ (UA)	OD (%)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	148	12,8	0,0	0
6	22	84	6,9	3,3	0
12	34	90	9,7	10,4	7
18	66	43	9,3	5,9	24
24	161	9	0,2	2,5	46
30	200	10	0,2	6,0	67
36	212	10	1,2	9,7	88
42	202	2	0,1	15,5	98
48	197	12	1,2	23,8	112

Resultados similares se obtuvieron con un suministro idéntico de vitamina B₁₂ con la mitad de concentración o con adiciones de bolos de vitamina B₁₂ a lo largo del transcurso de la fermentación. El título obtenido más elevado era 114 g/l.

EJEMPLO 2A

COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE 1,3-PROPANODIOL Y GLICEROL CON LAS CEPAS DE *E. COLI* RJ8/pAH48/pDT29 Y RJ8/pAH48/pKP32

Los precultivos de RJ8/pAH48pDT29 y RJ8/pAH48/pKP32 se prepararon usando viales congelados, des-congelados y se dejaron crecer en 500 mL de 2YT con 200 mg/L de carbenicilina y 50 mg/L de espectinomicina. El contenido total del matraz se utilizó para inocular el fermentador. El fermentador funcionaba a 35°C y un punto de ajuste d6 del 10%; todos los demás parámetros de control son tal y como se describen en los Métodos Generales. RJ8/pAH48/pKP32 es idéntico a RJ8/pAH48/pDT29 salvo que *dhaT* está delecionado. La estrategia de la vitamina B₁₂ para cada fermentación se detalla más abajo.

Fermentación con RJ8/pAH48/pDT29.

Un resumen representativo de la fermentación, de la conversión de glucosa en 1,3-propanodiol (1,3-PD) empleando la cepa de *E. coli* RJ8/pAH48/pDT29 se proporciona en la Tabla 2A.1. La vitamina B₁₂ se proporcionó como adiciones de bolos de 2, 16 y 16 mg a las 2,8 y 26 h, respectivamente. El rendimiento en 1,3-propanodiol era del 35% en peso (g de 1,3-propanodiol/g de glucosa consumida) y se obtuvo un título de 50,1 g/L de 1,3-propanodiol.

TABLA 2A.1

Sumario de la fermentación representativa, de la conversión de glucosa en 1,3-propanodiol (1,3-PD) empleando la cepa de *E. coli* RJ8/pAH48/pDT29

Tiempo (h)	DO ₅₅₀ (UA)	OD (%)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	140	10,6	0,1	0,0
6	5	107	11,1	0,5	0,4
10	16	90	8,5	1,7	1,3
14	25	86	1,8	2,4	5,9
19	38	53	3,5	5,9	15,4
25	53	38	0,1	9,2	26,7
31	54	10	4,5	7,4	39,0
37	37	23	17,2	6,0	45,0
43	21	13	9,9	7,7	50,1

Fermentación mejorada con RJ8/pAH48/pKP32.

5 Un resumen representativo de la fermentación, de la conversión de glucosa en 1,3-propanodiol (1,3-PD) usando la cepa de *E. coli* RJ8/pAH48/pKP32 se proporciona en la Tabla 2A.2. La vitamina B₁₂ se proporciona como adiciones de bolos de 48 y 16 mg aproximadamente a las 26 y 44 h, respectivamente. El rendimiento en 1,3-propanodiol era del 34% en peso (g de 1,3-propanodiol/g de glucosa consumida) y se obtuvo un título de 129 g/L de 1,3-propanodiol.

10

TABLA 2A.2

Sumario de la fermentación representativa, de la conversión mejorada de glucosa en 1,3-propanodiol (1,3-PD) empleando la cepa de *E. coli* RJ8/pAH48/pKP32

Tiempo (h)	DO ₅₅₀ (UA)	OD (%)	Glucosa (g/L)	Glicerol (g/L)	1,3-PD (g/L)
0	0	150	12,6	0,1	0
6	12	113	6,0	2,6	0
12	24	99	0,0	10,6	0
18	51	76	2,4	28,9	0
24	78	82	2,4	44,2	5
30	114	70	3,8	26,9	33
36	111	72	0,0	20,0	57
42	139	65	0,1	21,9	69
48	157	36	0,1	22,4	79
55	158	25	0,2	21,4	94
64	169	14	0,1	15,8	113
72	169	12	0,1	13,4	119
74	162	14	0,1	14,8	129

Producción de 1,3-propanodiol y glicerol con la cepa de *E. coli* RJ8.n/pAH48/pKP32.

15 La cepa RJ8.n se transformó con los plásmidos pAH48 y pKP32. La producción de 1,3-propanodiol (y glicerol) se determinó en fermentadores de 14 L, tal y como se describe en los Métodos Generales. Un vial congelado de RJ8.n/pAH48/pKP32, descongelado se transfirió a 500 mL de LB con 200 mg/L de carbenicilina y 50 mg/L de espectinomicina para preparar el precultivo. El cultivo se transfirió a un fermentador de siembra y se dejó crecer durante 16 h antes de transferir 1 L del cultivo al fermentador de producción. En ese momento, la DO₅₅₀ había alcanzado 50

UA y 30 g/L de glicerol se habían acumulado en el caldo. Los fermentadores de siembra y de producción se accionaron a 35°C y un punto de ajuste d6 del 10%; todos los demás parámetros de control son tal y como se han descrito en los Métodos Generales.

La vitamina B₁₂ se añadió al tanque de producción en bolos de 16 mg a las 12 h, 17,3 h, 22,8 h y 27,5 h. El título final era 112,7 g/L de 3G y el rendimiento en masa era de 31,6%.

EJEMPLO 3

CONSTRUCCIÓN Y PRESTACIÓN DE MATRACES DE AGITACIÓN DE UNA CEPA DE *E. COLI* CON UNA DELECCIÓN EN EL REGULADOR GLOBAL *arcA*

Una delección *arcA* [para la referencia, véase GenBank, nº de orden U00096] se realizó sustituyendo 0,6 kb de la región codificadora con el casete FRT-CmR-FRT de pKD3. Un casete de sustitución se amplificó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3 empleando pKD3 como molde. El cebador SEQ ID NO:2 contiene 41 pb de homología con el extremo 5' de *areA* y 20 pb de homología con pKD3. El cebador SEQ ID NO:3 contiene 42 pb de homología con el extremo 3' de *arcA* y 20 pb de homología con pKD3. El producto de la PCR se purificó en gel y se electroporó en células MG1655/pKD46 competentes. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 12,5 mg/L de cloranfenicol. La delección del gen *areA* se confirmó con la PCR, usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5. La cepa de tipo silvestre proporcionó un producto de la PCR de 0,7 kb, mientras que la cepa recombinante proporcionaba un producto de PCR característico de 1,1 kb. La cepa se ha denominado MG1655 Δ *arcA*::Cm. Un material lisado de P1 se preparó y se utilizó para trasladar la mutación a la cepa KLndh81 para formar KLndh81 Δ *arcA*::Cm.

La cepa KLndh81 Δ *arcA*::Cm y la cepa testigo KLndh81 se electrotransformaron con el plásmido pSY-CO101. Una colonia de cada cepa se incubó 10 h en medio LB con 50 mg/L de espectinomicina. Un volumen de 200 μ L de estos cultivos se transfirió a continuación a un matraz Erlenmeyer con placas deflectoras de 250 ml, que contenía 10 mL de medio TM2 con 40 g/L de glucosa, 50 mg/L de espectinomicina y 2 mg/L de vitamina B₁₂. Los matraces se incubaron a 300 rpm y 34°C durante 40 h. Los resultados en la Tabla 3 muestran que la mutación *arcA* mejora el rendimiento molar de la producción de glicerol y de 1,3-propanodiol.

TABLA 3

Producción de glicerol y de 1,3- propanodiol en el testigo de *E. coli* y en cepas Δ *arcA*::Cm

Cepa	Glicerol (g/L)	1,3-Propanodiol (g/L)	DO 550 nm	Rendimiento molar (mol/mol)
KLndh81 pSYCO101	5,8	10,7	29,2	0,87
KLndh81 Δ <i>arcA</i> pSYCO101	6,8	11,4	25,9	0,95

EJEMPLO 4

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *E. COLI* CON SISTEMA DE FOSFOTRANSERASA NEGATIVO (PTS⁻) CON PROMOTORES TRC QUE CONTROLAN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL SIMPORTADOR GALACTOSA-PROTÓN (*galP*) Y GLUCOCINASA (*glk*)

Construcción de un casete *loxP*-CAT-*loxP*-Trc (pTrCm42).

El ADN lineal se obtuvo a partir del plásmido pTrc99a (Pharmacia) digerido con *Hind*III y *Nco*I, rellenado con la polimerasa de ADN T4, circularizado y transformado en *E. coli* TOP-10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de la selección sobre placas de agar de Luria que contenían 50 mg/L de carbenicilina, el plásmido resultante (pTrc1) se purificó y se sometió a un análisis con enzimas de restricción, para confirmar que la región del ADN originalmente presente entre *Hind*III y *Nco*I, estaba ausente.

El único sitio *Bsp*M1 en pTrc1 (aguas arriba de la región -35 del promotor *trc*) se utilizó para insertar un casete que contenía un gen de resistencia al cloranfenicol (CAT) flanqueado por sitios *loxP*. El ADN lineal se obtuvo a partir de pTrc1 digerido con *Bsp*M1, se purificó en gel usando un equipo de reactivos para la extracción del gel QIA-quick (QIAGEN), se rellenó con la polimerasa de ADN T4, y se ligó a un casete *loxP*-CAT-*loxP*. El casete *loxP*-CAT-*loxP* se obtuvo a partir del plásmido pLoxCat1, véase la SEQ ID NO:6, mediante digestión con *Stu*I y *Bam*H1. pLoxCat1 es similar a pLoxCat2 (Palmeros y otros, *supra*). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* TOP-10 (Invitrogen) y la selección se realizó en placas de agar de Luria que contenían 50 mg/L de carbenicilina y 20 mg/L de cloranfenicol. El plásmido se obtuvo y se realizó el análisis con enzimas de restricción. Dos plásmidos, que contenían *loxP*-CAT-*loxP*-Trc con el casete *loxP*-CAT-*loxP* en la misma orientación y en la opuesta en relación con el promotor *trc*, se denominaron pTrCm41 y pTrCm42, respectivamente.

Construcción de un molde para la sustitución con el promotor *trc* para *galP* (pR6KgalP).

Un casete de ADN que contenía el promotor *trc* y el operador *lac*, con un casete aguas arriba *loxP*-CAT-*loxP*, se

amplificó con PCR a partir de pTrCm42, usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. La pareja de cebadores incorpora 40 pb de homología con la región aguas arriba de *galP* en cada extremo del producto de la PCR. Los parámetros de la PCR eran 95°C durante 1 min; 55°C durante 1 min; 72°C durante 2 min, 30 ciclos usando la polimerasa *Taq* (Roche). El producto se subclonó en pUni/His5 R6K (Invitrogen) para generar el plásmido pR6KgalP.

Construcción de un molde para la sustitución con el promotor *trc* para *glk* (pR6Kglk).

Un casete de ADN que contenía el promotor *trc* y el operador *lac* con un casete *loxP*-CAT-*loxP* aguas arriba, se amplificó a partir de pTrCm42 mediante PCR usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. La pareja de cebadores SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 incorpora 39 (con una delección de una base) y 40 pb de homología, respectivamente, con la región aguas arriba de *glk*, en cada extremo del producto de la PCR. Los parámetros de la PCR eran 95°C durante 1 min; 55°C durante 1 min; 72°C durante 2 min, 30 ciclos usando la polimerasa *Taq* (Roche). El producto se subclonó en Echo pUni/His5 R6K (Invitrogen) para generar el plásmido pR6Kglk.

Construcción de una cepa de *E. coli* Δ *ptsHlcr* (KLpts7).

Un derivado negativo para PTS (*ΔptsHlcr*) de la cepa de *E. coli* KLnhd81, se obtuvo mediante la transducción de *vir* de P1, usando un derivado de la cepa de *E. coli* NF9 como donante (Flores y otros, Nature Biotechnology 14, 620-623 (1996)). La transducción sustituye al operón que comprende *ptsH*, *ptsI* y *cr* con un marcador de la resistencia al antibiótico kanamicina (Levy y otros, Gene 86, 27-33 (1990)) para proporcionar la cepa KLpts7. Extendido en placas de agar MacConkey (lactosa) + 1% de glucosa, KLpts7 muestra un fenotipo de colonia blanco.

Sustitución del promotor natural *galP* por el promotor sintético *trc* (KLgalP-trc).

Un producto de la amplificación con PCR que comprende el casete *loxP*-CAT-*loxP*-Trc y que incorpora 40 pb de homología con la región aguas arriba de *galP* [para la referencia, véase GenBank, n° de orden U00096] en cada extremo, se generó usando la polimerasa de ARN *rTth* (Perkin Elmer), pR6KgalP como molde y la pareja de cebadores SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. El casete de integración amplificado con PCR se transformó en células electrocompetentes KLpts7 que contenían pKD46 para la integración, usando el sistema Red de lambda, tal y como se describe en Datsenko y Wanner, *supra*. La selección se realizó sobre placas LB que contenían 10 mg/L de cloranfenicol. La integración satisfactoria de este casete sustituye la región 38 a 181 pb aguas arriba del codón de iniciación ATG de *galP* (para la referencia, véase GenBank, n° de orden U00096) por un casete *loxP*-CAT-*loxP*-Trc (SEQ ID NO:11) para proporcionar la cepa KLpts::galP-trc. La integración se confirmó mediante análisis con PCR usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8 (amplificando el sitio de la integración para proporcionar un producto de 1,4 kb) y la pareja de cebadores SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13 (amplificando el sitio de la integración, incluyendo regiones aguas arriba y aguas abajo, para proporcionar un producto de 2,1 kb). Los parámetros de la PCR eran 95°C durante 1 min; 55°C durante 1 min; 72°C durante 2 min, 30 ciclos usando la polimerasa *Taq* o la polimerasa *rTth*. KLpts::galP-trc, extendido sobre placas de agar MacConkey (lactosa) + glucosa al 1%, muestra un fenotipo de colonias rojo claro. El marcador de cloranfenicol se eliminó tal y como se describe en Palmeros y otros, *supra*. La eliminación se confirmó mediante análisis con PCR usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13 (para proporcionar un producto de 1,1 kb) y la cepa resultante se denominó KLgalP-trc.

Sustitución del promotor natural *glk* por el promotor sintético *trc* (KLGG).

Un producto de la amplificación con PCR que comprende un casete *loxP*-CAT-*loxP*-Trc y que incorpora aproximadamente 40 pb de homología con la región aguas arriba de *glk* [para la referencia, véase GenBank, n° de orden U00096], en cada extremo, se generó usando la polimerasa de ARN *rTth* (Perkin Elmer), como molde pR6Kglk y la pareja de cebadores SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. El casete de integración amplificado con PCR se transformó en células electrocompetentes KLgalP-trc que contenían pKD46 para la integración, usando el sistema Red de lambda, tal y como se ha descrito anteriormente. La selección se realizó sobre placas LB que contenían 10 mg/L de cloranfenicol. La integración satisfactoria de este casete sustituye la región de 40 a 137 pb aguas arriba del codón de iniciación ATG de *glk* (para la referencia, véase GenBank, n° de orden U00096) por un casete *loxP*-CAT-*loxP*-Trc (SEQ ID NO:11). La integración se confirmó por análisis con PCR, usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15 (amplificando el sitio de la integración, que incluye regiones aguas arriba y aguas abajo, para proporcionar un producto de 2,4 kb). Después de extender sobre placas con agar MacConkey (lactosa) + glucosa al 1%, las colonias exhiben un color rojo oscuro, indicando un incremento de la conversión de glucosa a ácido, comparado con los progenitores (KLgalP-trc). El marcador de cloranfenicol se eliminó tal y como se ha descrito anteriormente y el análisis posterior con PCR (usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15 para proporcionar un producto de 1,3 kb), proporcionó la cepa KLGG.

Delección del gen *arcA*, que codifica un regulador global (KLGG Δ *arcA*).

Un material lisado de P1 de la cepa MG1655 *AarcA*::Cm se preparó y se utilizó para trasladar la mutación a la cepa KLGG. Un clon resultante resistente al cloranfenicol, KLGG Δ *arcA*::Cm, se comprobó por PCR genómica para asegurar que la mutación estaba presente. El marcador de la resistencia al cloranfenicol se eliminó usando la recombinasa FLP (Datsenko y Wanner, *supra*) y esta cepa se denominó KLGG Δ *arcA*.

Delección del gen *edd*, que codifica el gen de la deshidratasa de 6-fosfogluconato (KLGG Δ *arcA* Δ *edd*, tam-

bién denominada FMP).

Una delección de *edd* [para la referencia, véase GenBank, número de orden U00096] se obtuvo sustituyendo 1,7 kb de la región codificadora por un casete *loxP*-CAT-*loxP* procedente de pLoxCat2. Un casete de sustitución se amplificó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17. El cebador SEQ ID NO:16 contiene 80 pb de homología con el extremo 5' de *edd* y 18 pb de homología con el molde pLoxCat2. El cebador SEQ ID NO:17 contiene 78 pb de homología con el extremo 3' de *edd* y 19 pb de homología con pLoxCat2. El producto de la PCR se purificó en gel y se electroporó en células competentes KLGG Δ arcA/pKD46. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 12,5 mg/L de cloranfenicol. La delección del gen *edd* se confirmó con PCR usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:19. La cepa de tipo silvestre proporciona un producto de la PCR de 2,2 kb, mientras que el recombinante proporciona un producto de la PCR característico de 1,6 kb. Esta cepa se ha denominado KLGG Δ arcA Δ edd::cat. El marcador de cloranfenicol se eliminó usando la recombinasa Cre (Palmeros y otros, *supra*) y esta cepa se ha denominado KLGG Δ arcA Δ edd o, alternativamente, FMP.

Selección y caracterización de una cepa FMP que muestra una tasa mejorada de consumo de glucosa.

Invariablemente, las células que comprendían Δ pts-Hlcrr, la sustitución con el promotor *trc* del promotor natural *galP*, y la sustitución con el promotor *trc* del promotor natural *glk* (las tres modificaciones tal y como se han descrito en el Ejemplo 4), mostraban inicialmente un crecimiento lento. También invariablemente, una selección posterior (tal y como se describe más abajo) conduce a un derivado con crecimiento más rápido. La actividad glucocinasa, sometida a ensayo en extractos sin células, era típicamente tres veces más elevada en el derivado con crecimiento más rápido que cuando se comparaba con el progenitor con crecimiento más lento.

La cepa de *E. coli* FMP, transformada con el plásmido pSYCO103, se dejó crecer en un fermentador de 14 L, esencialmente tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los viales para el almacenamiento a -80°C (materiales con 15% de glicerol) se prepararon a lo largo del curso de la fermentación. Una placa LB se sembró a partir de la parte alícuota tomada a las 33 h (DO₅₅₀ era 30,7 UA) y se recuperaron las colonias individuales y se denominaron "FMP/pSYCO103 seleccionadas". Colonias individuales se obtuvieron de forma semejante a partir de la cepa FMP que no contenía plásmido y se denominaron "FMP seleccionadas".

Los genes *galP* y *glk*, que incluyen la región promotora introducida *trc*, se amplificaron con PCR a partir de dos colonias de "FMP/pSYCO103 seleccionadas" y una colonia de "FMP seleccionada", empleando la pareja de cebadores SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:13 y la pareja de cebadores SEQ ID NO:14/SEQ ID NO:15, respectivamente. El análisis de las secuencias de estas tres muestras se realizó usando los mismos cebadores. En cada caso, el gen *galP* y la región promotora permanecían inalterados en relación con la cepa progenitora, mientras que el gen *glk* y la región promotora contenían un cambio idéntico, solo de un par de bases, cuando se comparaba con la cepa progenitora. Los dos materiales aislados a partir de "FMP/pSYCO103 seleccionada" y un material aislado a partir de "FMP seleccionada" contenían la secuencia identificada como SEQ ID NO:20 en la región -35 a -10 del promotor *trc* que controlaba la expresión de *glk*, comparados con la secuencia progenitora correspondiente SEQ ID NO:21. La cepa que se originaba a partir de "FMP seleccionada" a partir de la cual se habían obtenido las secuencias de *galP* y *glk*, se denominó cepa FMP::Km.

EJEMPLO 5

EJEMPLOS COMPARATIVOS DE FERMENTACIONES DE GLUCOSA EN 1,3-PROPANODIOL USANDO CEPAS FMP/pSYCO103 Y FMP::Km/pSYCO103

Las cepas FMP y FMP::Km se transformaron con el plásmido pSYCO103. La producción de 1,3-propanodiol se determinó en fermentadores de 14 L tal y como se describe en los Métodos Generales, con las siguientes diferencias en los parámetros de control o en el fermentador. Un vial congelado de FMP/pSYCO103, descongelado se transfirió a 500 mL de 2YT con 50 mg/L de espectinomicina para preparar el precultivo. El punto de ajuste dO era del 15%. La vitamina B₁₂ se añadió al fermentador en bolos de 16 mg a las 30, 43 y a 51 h.

Un vial congelado de FMP::Km/pSYCO103, descongelado se transfirió a 500 mL de SBG al 1% con 50 mg/L de espectinomicina, para preparar el precultivo. La vitamina B₁₂ se añadió al fermentador en bolos de 16 mg a las 21, 40 y 40,5 h.

La Figura 1 muestra que la producción de 1,3-propanodiol con FMP::Km/pSYCO103 es más rápida que con FMP/pSYCO103.

EJEMPLO 6

DE LA EXPRESIÓN ALTERADA MEDIANTE MANIPULACIÓN GENÉTICA DE LA DESHIDROGENASA DE GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO (*gapA*) EN CEPAS DE *E. COLI* PARA LA PRODUCCIÓN DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLUCOSA

Disminución de la expresión de GapA alterando el codón de iniciación

El nivel de deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato, GapA, disminuyó sustituyendo el codón de iniciación ATG del gen *gapA*, por un codón de iniciación GTG o TTG.

El gen de *E. coli gapA* más las secuencias flanqueantes aguas arriba y aguas abajo se amplificaron con PCR, a partir de la cepa de *E. coli* MG1655, usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23. El producto de la PCR se clonó directamente desde la reacción de la PCR en pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) para formar pDT50. Los plásmidos pDT50 y pLitmus 28 (New England Biolabs, Inc.) se digirieron con *SphI* y *BamH I* y el fragmento del gen *gapA* y el vector, respectivamente, se purificaron en gel y se ligaron. El plásmido resultante, pDT51, se transformó en TOP10 de *E. coli* (Invitrogen).

Los plásmidos mutantes en *gapA* se construyeron usando el método de mutagénesis dirigido al sitio "QuickChange 1-Day" de Stratagene (Stratagene, La Jolla, CA). El plásmido molde, pDT51, se mezcló con cualquiera de la pareja de cebadores SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:25 para crear la mutación GTG o la pareja de cebadores SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27, para crear la mutación TTG. Después de la amplificación con PCR, las reacciones se digirieron con *DpnI* para eliminar el plásmido molde y dejar solamente los plásmidos amplificados. Los plásmidos se transformaron a continuación en TOP10 de *E. coli* (Invitrogen).

Las estructuras artificiales *gapA*-GTG y *gapA*-TTG se amplificaron con PCR usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23. Los productos de la PCR se electroporaron dentro de la cepa con *gapA* desactivada, KLP23A112. La cepa de *E. coli* KLP23A112 se construyó transduciendo KLP23 con un lisado del fago P1 obtenido a partir de DS112 de *E. coli* ("Genetic Stock Center" de *E. coli*), una cepa con la delección de *gapA* que contenía un marcador CmR. Los recombinantes se seleccionaron por el crecimiento sobre placas de LB sin glucosa añadida y sensibles al cloranfenicol. La secuenciación confirmó la integración satisfactoria de las mutaciones GTG y TTG. Las cepas mutadas se denominaron KLPAGTG y KLPATTG, respectivamente. La medición de la actividad de GapA en las cepas KLPAGTG y KLPATTG mostraba que los niveles de GapA eran del 4% y < 1% de la cepa testigo KLP23, respectivamente.

Las cepas KLP23, KLPAGTG y KLPATTG se transformaron con el plásmido pSYCO101 y se sometió a ensayo la producción de 1,3-propanodiol en medio TM2 que contenía 40 g/L de glucosa, 50 mg/L de espectinomicina y 1 mg/L de vitamina B₁₂. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Resumen representativo de los matraces de agitación de la conversión de glucosa en 1,3-propanodiol usando las cepas de *E. coli* KLP 23/pSYCO101, KLP AGTG/pSYCO101 y KLPATTG/pSYCO101

Cepa	Glicerol (g/L)	1,3-Propanodiol (g/L)	Rendimiento molar (mol/mol)
KLP23 pSYCO101	5,8	10,7	0,87
KLPAGTG pSYCO101	0,7	1,3	0,11
KLPATTG pSYCO101	0,2	0,4	0,04

Alteración de la expresión de GapA sustituyendo el promotor.

La sustitución del promotor natural *gapA* por el promotor sintético corto 1.5 GI (SEQ ID NO:28) se realizó sustituyendo 225 pb de la secuencia aguas arriba de *gapA* [para la referencia, véase GenBank, número de orden U00096] por FRT-CmR-FRT y un promotor manipulado genéticamente. El casete de sustitución se amplificó por PCR con la pareja de cebadores SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30, usando pKD3 como molde. El cebador SEQ ID NO:29 contiene 39 pb de homología con *gapA* que incluyen el inicio ATG, contiene un promotor corto 1.5 GI y contiene 20 pb de homología con el molde pKD3. El cebador SEQ ID NO:30 contiene 59 pb de homología con la secuencia aguas arriba de *gapA* y 21 pb de homología con pKD3. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se electroporaron dentro de células competentes MG1655/pKD46 para proporcionar MG1655 1.5gapA::Cm. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 12,5 mg/L de cloranfenicol. La integración satisfactoria del casete sustituye la región de 34-258 pb aguas arriba del codón de iniciación ATG de *gapA* por un casete de promotor FRT-CmR-FRT-short 1.5 GI. Se preparó un material lisado del fago P1 y se utilizó para trasladar la mutación a FMP'::Km. Esta cepa se denominó FMP'::Km 1.5gapA::Cm.

El promotor corto de *gapA* 1.5 GI en MG1655 1.5gapA::Cm se sustituyó por el promotor corto 1.20 GI (SEQ ID NO:31) o el promotor corto 1.6 GI (SEQ ID NO:32). Para crear la cepa 1.20 gapA, un casete de sustitución se amplificó por PCR con la pareja de cebadores SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34 usando ADN genómico procedente de MG1655 1.5gapA::Cm como molde. El cebador SEQ ID NO:33 contiene 24 pb de homología con la región aguas arriba de *gapA*. El cebador SEQ ID NO:34 contiene homología con la región aguas arriba de *gapA* en MG1655 1.5gapA::Cm y contiene el promotor corto 1.20 GI. Para crear la cepa 1.6gapA, un casete de sustitución se amplificó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:35 empleando ADN genómico procedente de MG1655 1.5gapA::Cm como molde. El cebador SEQ ID NO:35 tiene homología con la región aguas arriba de *gapA* en MG1655 1.5gapA::Cm y contiene el promotor corto 1.6 GI. El casete de sustitución del promotor corto 1.20 GI y el casete de sustitución del promotor corto 1.6 GI se utilizaron para sustituir el promotor natural *gapA* de MG1655, tal y como se ha descrito anteriormente, para proporcionar las cepas MG1655 1.20gapA::Cm y MG1655 1.6gapA::Cm,

respectivamente. MG1655 1.20gapA::Cm y MG1655 1.6gapA::Cm se utilizaron para sustituir el promotor natural *gapA* de la cepa FMP'::Km (usando la transducción de P1, tal y como se ha descrito anteriormente) para proporcionar las cepas FMP'::Km 1.20gapA::Cm y FMP'::Km 1.6gapA::Cm, respectivamente.

La actividad deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato se determinó usando los extractos sin células, preparados a partir de las cepas FMP'::Km 1.20gapA::Cm, FMP'::Km 1.5gapA::Cm, FMP'::Km 1.6gapA::Cm y FMP'::Km como testigo. Los valores obtenidos, comparados con los del testigo, eran 10%, 25% y 140% para las cepas FMP'::Km 1.20gapA::Cm, FMP'::Km 1.5gapA::Cm, FMP'::Km 1.6gapA::Cm, respectivamente.

Las cepas que contenían las sustituciones del promotor GI se transformaron con el plásmido pSYCO106 y se compararon con la cepa progenitora para estudiar la producción de 1,3-propanodiol en medio TM2 que contenía 20 g/L de glucosa, 50 mg/L de espectinomicina y 1 mg/mL de vitamina B₁₂. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Resumen representativo de matraces de agitación de cepas *gapA* con promotor FMP'::Km GI transformadas con el plásmido pSYCO106

Cepa	Glicerol (g/L)	1,3-Propanodiol (g/L)	Rendimiento molar (mol/mol)
FMP'::Km/pSYCO106	1,8	6,8	1,07
FMP'::Km 1.6gapA/pSYCO106	4,1	3,3	0,92
FMP'::Km 1.5gapA/pSYCO106	6,6	3,6	1,21
FMP'::Km 1.20gapA/pSYCO106	7,6	2,8	1,26

EJEMPLO 7

ELIMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE FMP'::Km 1.5gapA::Cm.

El marcador cloranfenicol se eliminó de la cepa FMP'::Km 1.5gapA::Cm (tal y como se describe en la sección de Métodos Generales) para proporcionar las cepas FMP'::Km 1.5gapA.

El marcador de kanamicina introducido en FMP'::Km 1.5gapA como consecuencia de la preparación de KLndh81 PTS negativo (Δ ptsHlcr), se sustituyó por un casete separable FRT-Cm-FRT, mediante la transducción con P1 procedente de MG1655 Δ ptsHlcr::Cm. Una delección *ptsHlcr* en MG1655 se realizó con un casete de sustitución amplificado con la pareja de cebadores SEQ ID NO:54 y SEQ ID NO:55 usando pKD3 como molde. El cebador SEQ ID NO:54 contiene 78 pb de homología con la región restante de *ptsH* que se dejó en el cromosoma de la cepa FMP'::Km 1.5gapA y 20 pb de homología con pKD3. El cebador SEQ ID NO:55 contiene 77 pb de homología con la región restante de *cr* en la cepa FMP'::Km 1.5gapA y 20 pb de homología con pKD3. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se electroporaron en células competentes MG1655/pKD46. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 12,5 mg/L de cloranfenicol. El análisis con PCR confirmó la integración del casete. Extendido sobre placas con agar MacConkey (lactosa) + glucosa al 1%, MG1655 Δ ptsHlcr::Cm muestra un fenotipo blanco de las colonias. Un material lisado del fago P1 se preparó y el marcador Cm se transdujo en FMP'::Km 1.5gapA. Las cepas recombinantes se seleccionaron con cloranfenicol y el análisis con PCR confirmó la integración satisfactoria del casete. El marcador de cloranfenicol se eliminó usando la recombinasa FLp y la secuenciación (usando el cebador SEQ ID NO:56) confirmó la eliminación del marcador de cloranfenicol. La cepa resultante se denominó FMP' 1.5gapA.

EJEMPLO 8

DEMOSTRACIÓN DEL ALTO RENDIMIENTO EN 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLUCOSA USANDO LA CEPA DE *E. COLI* FMP' 1.5gapA/pSYCO106

La cepa FMP' 1.5gapA se transformó con el plásmido pSYCO106. La producción de 1,3-propanodiol y glicerol se determinó en fermentadores de 14 L, tal y como se describe en los Métodos Generales con las siguientes diferencias en los parámetros de control para el fermentador. Un vial congelado de FMP' 1.5gap/pSYCO106, descongelado se transfirió a 500 mL de SBG al 1% con 50 mg/L de espectinomicina para preparar el precultivo. Se añadió la vitamina B₁₂ al fermentador en 16 bolos de mg antes de la inoculación y a las 28 horas. La concentración final de 1,3-propanodiol era de 129 g/L y el rendimiento en masa era del 40,2%.

EJEMPLO 9

MANIPULACIÓN GENÉTICA DE UN MUTANTE DE LA SINTASA DE METILGLIOXAL (*mgsA*) EN *E. COLI*

Las delecciones de *mgsA* [para la referencia, véase GenBank, número de orden U00096] se construyeron sustituyendo 0,4 kb de la región codificadora por el casete FRT-Kan-FRT de pKD4. Un casete de sustitución se amplificó con PCR con la pareja de cebadores SEQ ID NO:36 y SEQ ID NO:37, empleando pKD4 como molde. El cebador SEQ ID NO:36 contiene 40 pb de homología con el extremo 5' de *mgsA* y 20 pb de homología con el ADN molde, pKD4. El cebador SEQ ID NO:37 contiene 40 pb de homología con el extremo 3' de *mgsA* y 20 pb de homología con pKD4. El producto de la PCR se purificó en gel y se electroporó dentro de células competentes MG1655/pKD46. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 12,5 mg/L de kanamicina. La delección del gen *mgsA* se confirmó por PCR, usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:38 y SEQ ID NO:39. La cepa de tipo silvestre proporciona un producto de la PCR de 1,3 kb, mientras que la cepa recombinante proporciona un producto de la PCR característico de 2,4 kb. Esta cepa se denominó MG1655 $\Delta mgsA::kan$. Una vez que se había obtenido el mutante *mgsA* en MG1655, se preparó un material lisado del fago P1 y se utilizó para trasladar la mutación a FMP' 1.5gapA (Ejemplo 8). El marcador de la resistencia a kanamicina se eliminó usando la recombinasa FLP (Datsenko y Wanner, *supra*) y esta cepa se ha designado FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$.

FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ y sus progenitores se transformaron con el plásmido pSYCO106 para proporcionar FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ /pSYCO106 y FMP' 1.5gapA/pSYCO106, respectivamente.

Las cepas se sometieron a ensayo para estudiar la producción de 1,3-propanodiol en medio TM2 que contenía 20 g/L de glucosa, 50 mg/L de espectinomicina y 1 mg/L de vitamina B₁₂. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

Resumen representativo de los matraces de agitación de las cepas FMP' 1.5gapA/pSYCO106 y FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ /pSYCO106

Cepa	Glicerol (g/L)	1,3-Propanodiol (g/L)	Rendimiento molar (mol/mol)
FMP' 1.5gapA/pSYCO106	6,6	3,6	1,21
FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ /pSYCO106	8,3	2,4	1,26

EJEMPLO 10

FERMENTACIÓN DE GLUCOSA EN 1,3-PROPANODIOL USANDO LA CEPA DE *E. COLI* FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ /pSYCO106

La cepa FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ se transformó con el plásmido pSYCO106. La producción de 1,3-propanodiol (y glicerol) se determinó en fermentadores de 14 L, tal y como se describe en los Métodos Generales, con las siguientes diferencias de en los parámetros de control para los fermentadores. Una colonia individual procedente de una placa de nuevo aporte (LA con 50 mg/L de espectinomicina) de FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ /pSYCO106 se transfirió a 30 mL de LB con 100 mg/L de espectinomicina en un matraz de 250 mL para preparar el precultivo. Después de la incubación a 34°C y 300 rpm hasta tener una DO₅₅₀ de 1 UA, 10,8 mL del cultivo se transfirieron al fermentador. El fermentador funcionaba con una limitación de glucosa durante la mayoría de la operación. La vitamina B₁₂ se añadió al fermentador en bolos de 16 mg antes de la inoculación, a las 28 h y a las 38 h. La concentración final de 1,3-propanodiol era 130 g/L y el rendimiento en masa era del 47,5%. Una operación con la glucosa mantenida en exceso (0-20 g/l) proporcionó 141 g/L de 1,3-propanodiol y un rendimiento en masa del 43,6%.

EJEMPLO 11

CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *E. COLI* CON UN PROMOTOR MANIPULADO GENÉTICAMENTE PARA LA CARBOXILASA DE FOSFOENOLPIRUVATO (*ppc*) MEDIANTE TRANSFORMACIÓN DE ADN LINEAR

La sustitución del promotor natural *ppc* por el promotor sintético corto 1.6 GI, se realizó sustituyendo 59 pb del casete aguas arriba de la secuencia *ppc* que contenía FRT-CmR-FRT y un promotor manipulado genéticamente. El producto de la PCR se amplificó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:40 y SEQ ID NO:41, usando pKD3 como molde. El cebador SEQ ID NO:40 contiene 80 pb de homología con la secuencia aguas arriba de *ppc* y 20 pb de homología con el molde pKD3. El cebador SEQ ID NO:41 contiene 39 pb de homología con la secuencia aguas arriba de *ppc*, contiene la secuencia del promotor corto 1.6 GI y contiene 20 pb de homología con pKD3. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se electroporaron en células competentes MG1655/pKD46. Las cepas recombinantes fueron seleccionadas sobre placas LB con 12,5 mg/L de cloranfenicol para proporcionar MG1655 1.6ppc::Cm. La integración satisfactoria del casete sustituye la región 90 a 148 pb aguas arriba del inicio ATG de *ppc* [para la referencia, véase GenBank, número de orden U00096] por un casete de promotor corto FRT-CmR-FRT 1.6 GI. La integración en la región aguas arriba de *ppc* se confirmó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:40 y SEQ ID NO:41. La cepa de tipo silvestre proporciona un producto de la PCR de 0,2 kb, mientras que la cepa recombinante proporciona un producto de la PCR característico de 1,2 kb. Este producto de la PCR se secuenció empleando el

cebador SEQ ID NO:42, que indicaba que la sustitución del promotor había tenido lugar con eficacia. Un material lisado del fago P1 se preparó y se utilizó para trasladar la mutación a la cepa FMP' 1.5gap Δ mgsA. Esta cepa se denominó FMP' 1.5gap Δ mgs 1.6ppc::Cm. El marcador de la resistencia al cloranfenicol se eliminó usando la recombinasa FLP (Datsenko y Wanner, *supra*), y la cepa resultante se electrotransformó con el plásmido pSYCO106 para proporcionar FMP' 1.5gap Δ mgs 1.6ppc/pSYCO106.

Los cultivos del matraz de agitación se utilizaron para evaluar la conversión de glucosa en 1,3-propanodiol en las cepas de *E. coli* FMP' 1.5gap Δ mgs/pSYCO106 y FMP' 1.5gap Δ mgs 1.6ppc/pSYCO106. Las cepas, que habían crecido sobre medio LB que contenía 50 mg/L de espectinomicina, durante 10 horas, se utilizaron para inocular (200 μ L) matraces Erlenmeyer con placas deflectoras de 250 mL que contenían 10 mL de medio TM2, 20 g/L de glucosa, 50 mg/L de espectinomicina y 2 mg/L de vitamina B₁₂. Los matraces se incubaron a 300 rpm y 34°C. Los resultados representativos se proporcionan en la Tabla 7. Un aumento en el rendimiento molar y una disminución de la producción de acetato se observaron con la adición de la mutación 1.6ppc a la cepa progenitora.

TABLA 7

Matraces de agitación para la conversión de glucosa en 1,3-Propanodiol (1,3-PD)

Cepa	Glicerol producido (g/L)	1,3-Propanodiol producido (g/L)	Acetato producido (g/L)	Rendimiento molar
FMP' 1.5gap Δ mgsA/pSYCO106	8,24	2,19	1,78	1,25
FMP' 1.5gap Δ mgs 1.6ppc/pSYCO106	7,5	3,34	0,34	1,32

La actividad carboxilasa de fosfoenolpiruvato (Ppc) se midió a partir de extractos sin células obtenidos de los matraces de agitación descritos inmediatamente más arriba. Las partes alícuotas de las células se recogieron en la fase crecimiento logarítmico, interrumpido por dos pases a través de una célula de prensa francesa, se centrifugaron durante 15 min a 14.000 rpm, y se ultracentrifugaron durante 1 h a 50.000 rpm. El material sobrenadante se eliminó y se utilizó como fuente de proteínas. La actividad específica de PPC se describe en la Tabla 8 más abajo. La sustitución del promotor natural ppc por el promotor corto 1.6 GI, incrementa tres veces la actividad enzimática de Ppc.

TABLA 8

Actividad específica de la enzima PPC

Cepa	Actividad específica carboxilasa de fosfoenolpiruvato (U/mg de proteína)
FMP'1.5gap Δ mgsA, pSYCO106	0,28
FMP'1.5gap Δ mgs 1.6ppc, pSYCO106	0,86

EJEMPLO 11 A

FERMENTACIÓN DE GLUCOSA A 1,3-PROPANODIOL USANDO LA CEPA DE *E. COLI* FMP' 1.5gapA Δ mgsA/pSYCO106

La producción de 1,3-propanodiol mediante FMP' 1.5 gapA Δ mgsA 1.6ppc/pSYCO106 se determinó en fermentadores de 14 L, tal y como se describe en los Métodos Generales, con las siguientes diferencias en los parámetros de control para fermentadores. Una colonia individual procedente de una placa de nuevo aporte (LA con 50 mg/L de espectinomicina) de FMP' 1.5gapA Δ mgsA 1.6ppc/pSYCO106 se transfirió a 30 mL de LB con 100 mg/L de espectinomicina en un matraz de 250 mL, para preparar el precultivo. Después de la incubación a 34°C y 300 rpm hasta tener una DO₅₅₀ de 1 UA, 10,8 mL del cultivo se transfirieron al fermentador. La vitamina B₁₂ se añadió al fermentador en bolos de 16 mg antes de la inoculación, a las 28 h y a las 38 h. La concentración final de 1,3-propanodiol era de 135,3 g/L y el rendimiento en masa era del 46,1%.

EJEMPLO 12

CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *E. COLI* CON UN PROMOTOR MANIPULADO GENÉTICAMENTE

PARA *yciK/btuR* MEDIANTE TRANSFORMACIÓN DE ADN LINEAL

Los genes *yciK* y *btuR* están presentes dentro de un operón aislado en *E. coli*. La sustitución del promotor natural *yciK-btuR* por el promotor corto sintético 1.6 GI, se realizó insertando un casete de 1,3 kb, aguas arriba de *yciK-btuR*. El casete de sustitución, que contenía FRT-CmR-FRT y un promotor manipulado genéticamente, se amplificó mediante PCR con la pareja de cebadores SEQ ID NO:43 y SEQ ID NO:44, usando pKD13 como molde. El cebador SEQ ID NO:43 contiene 70 pb de homología con la secuencia aguas arriba de *yciK-btuR* y 20 pb de homología con el molde pKD13. El cebador SEQ ID NO:44 contiene 30 pb de homología con la secuencia aguas arriba de *yciK-btuR*, contiene la secuencia del promotor corto 1.6 GI y contiene 20 pb de homología con pKD13. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se electroporaron en células competentes MG1655/pKD46. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 25,0 mg/L de kanamicina para proporcionar MG1655 1.6*yciK-btuR*::Km. La integración satisfactoria del casete daba como resultado una inserción entre las pb 27 y 28 aguas arriba del codón de iniciación ATG de *yciK* [para la referencia, véase GenBank, número de orden U00096] por un casete de promotor corto FRT-CmR-FRT 1.6 GI. La integración en la región aguas arriba de *yciK/btuR* se confirmó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:45 y SEQ ID NO:46. La cepa silvestre proporciona un producto de la PCR de 1.4 kb, mientras que la cepa recombinante proporciona un producto de la PCR característico de 2,8 kb. Un material lisado del fago P1 se preparó y se utilizó para trasladar la mutación a un derivado de la cepa FMP' 1.5gap Δ*mgS* 1.6ppc denominado Triple. Después de eliminar el antibiótico, se obtuvo la cepa 1.6*btuR* Triple.

EJEMPLO 12AFERMENTACIÓN DE GLUCOSA EN 1,3-PROPANODIOL USANDO LA CEPA DE *E. COLI* 1.6*btuR*/pSYCO109 TRIPLE

La cepa 1.6*btuR* Triple se transformó con pSYCO109. La producción de 1,3-propanodiol a través de 1.6*btuR*/pSYCO109 Triple, se determinó en fermentadores de 14 L, tal y como se describe en los Métodos Generales con las siguientes diferencias en los parámetros de control para fermentación. Una colonia individual procedente de una placa de nuevo aporte (LA con 50 mg/L de espectinomicina) de 1.6*btuR*/pSYCO109 Triple se transfirió a 30 mL de LB con 100 mg/L de espectinomicina en un matraz de 250 mL para preparar el precultivo. Después de la incubación a 34°C y 300 rpm hasta tener una DO₅₅₀ de 1 UA, se transfirieron 10,8 mL del cultivo al fermentador. La vitamina B₁₂ se añadió al fermentador en bolos de 8 mg antes de la inoculación, a las 28 h y a las 38 h. La concentración final de 1,3-propanodiol era de 123 g/L y el rendimiento en masa era del 45,7%.

EJEMPLO 13CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *E. COLI* CON UN PROMOTOR MANIPULADO GENÉTICAMENTE PARA *yqhD* MEDIANTE LA TRANSFORMACIÓN DE ADN LINEAL

La sustitución del promotor natural *yqhD* (deshidrogenasa de alcohol) con el promotor sintético corto 1.6 GI se realizó sustituyendo 967 pb aguas arriba de la secuencia de *yqhD*, que incluye el gen *yqhC*, por un casete que contiene FRT-CmR-FRT y un promotor manipulado genéticamente. El producto de la PCR se amplificó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48, usando como molde pKD3. El cebador SEQ ID NO:47 contiene 78 pb de homología con la secuencia aguas arriba de *yqhD* y 20 pb de homología con el molde pKD3. El cebador SEQ ID NO:48 incorpora 41 pb de homología (con una delección de 1 pb) con la secuencia aguas arriba de *yqhD*, 40 pb de homología con la secuencia del promotor corto 1.6 GI, y 19 pb de homología con pKD3. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se electroporaron en células competentes MG1655/pKD46. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 12,5 mg/L de cloranfenicol, para proporcionar MG1655 1.6*yqhD*::Cm. La integración satisfactoria del casete sustituye la región 50-1016 pb aguas arriba del inicio ATG de *yqhD* [para la referencia, véase GenBank, número de orden U00096] por un casete de promotor corto FRT-CmR-FRT 1.6 GI. La integración en la región aguas arriba de *yqhD* se confirmó por la secuenciación con el cebador SEQ ID NO:49 e indicaba que la sustitución del promotor tuvo lugar de forma eficaz. Un material lisado del fago P1 se preparó y se utilizó para trasladar la mutación a la cepa 1.6*btuR* Triple. Después de eliminar el antibiótico (tal y como se ha descrito anteriormente), se obtuvo la cepa 1.6*btuR* 1.6*yqhD* Triple.

EJEMPLO 13AFERMENTACIÓN DE GLUCOSA EN 1,3-PROPANODIOL USANDO LA CEPA DE *E. COLI* 1.6*btuR* 1.6*yqhD*/pSYCO109 Triple

La cepa 1.6*btuR* 1.6*yqhD* Triple se transformó con pSYCO109. La producción de 1,3-propanodiol a través de 1.6*btuR* 1.6*yqhD*/pSYCO109 Triple se determinó en fermentadores de 14 L, tal y como se describe en los Métodos Generales con las siguientes diferencias en los parámetros de control para fermentación. Una colonia individual procedente de una placa de nuevo aporte (LA con 50 mg/L de espectinomicina) de 1.6*btuR* 1.6*yqhD*/pSYCO109 Triple se transfirió a 30 mL de LB con 100 mg/L de espectinomicina, en un matraz de 250 mL para preparar el precultivo. Después de la incubación a 34°C y 300 rpm hasta obtener una DO₅₅₀ de 1 UA, 10,8 mL del cultivo se transfirieron al fermentador. La vitamina B₁₂ se añadió al fermentador en un solo bolo de 16 mg a las 20,6 h de tiempo transcurrido de la fermentación. La concentración final de 1,3-propanodiol era de 113,3 g/L y el rendimiento en masa era del 48,8%.

EJEMPLO 14CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *E. COLI* CON UNA MUTACIÓN POR DELECIÓN EN LA CINASA DE ACETATO (*ack*) Y FOSFOTRANSACETILASA (*pta*) MEDIANTE TRANSFORMACIÓN DE ADN LINEAL

La delección de *pta-ackA* [para la referencia, véase GenBank, número de orden U00096] se realizó sustituyendo 3,3 kb de la región codificadora, por el casete de FRT- CmR-FRT de pKD3. El casete de sustitución se amplificó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:51 usando pKD3 como molde. El cebador SEQ ID NO:50 contiene 80 pb de homología con el extremo 5' de *pta* y 20 pb de homología con el ADN molde, pKD3. El cebador SEQ ID NO:51 contiene 80 pb de homología con el extremo 3' de *ackA* y 20 pb de homología con pKD3. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se electroporaron en células competentes MG1655/pKD46. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 12,5 mg/L de cloranfenicol para proporcionar la cepa MG1655 Δ ackA-pta::Cm. La delección de los genes *pta-ackA* se confirmó por PCR, usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:52 y SEQ ID NO:53. La cepa de tipo silvestre proporcionó un producto de la PCR de 3,8 kb, mientras que la cepa recombinante proporcionaba un producto característico de la PCR de 1,6 kb. Un material lisado del fago P1 se preparó y se utilizó para trasladar la mutación a la cepa 1.6btuR 1.6yqhD Triple para formar la cepa 1.6btuR 1.6yqhD Δ ackA-pta::Cm Triple. El marcador de la resistencia al cloranfenicol se eliminó usando la recombinasa FLP (Datsenko y Wanner, *supra*) para proporcionar 1.6btuR 1.6yqhD Δ ackA-pta Triple (renombrado TripleTriple (TT)). Las cepas 1.6btuR 1.6yqhD Triple y las cepas TT se electrotransformaron con el plásmido pSYCO109.

EJEMPLO 15MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFOTRANSACETILASA (Pta) EN LA CEPA TRIPLE TRIPLE/pSYCO109 COMPARADA CON LA CEPA 1.6btuR 1.6vqhD/pSYCO109 TRIPLE

Se realizaron fermentaciones con TT/pSYCO109 y 1.6btuR 1.6yqhD Triple/pSYCO109 en fermentadores de 14 L, tal y como se ha descrito en los Métodos Generales con las siguientes diferencias en los parámetros de control para fermentación. Una fermentación típica con 1.6btuR 1.6yqhD/pSYCO106 Triple se ha descrito en el Ejemplo 13A.

Un precultivo de TT/pSYCO109 se dejó crecer en 30 mL de LB con 100 mg/L de espectinomicina en un matraz de 250 mL hasta obtener una DO₅₅₀ de aproximadamente 1 UA. Un fermentador de siembra preparado tal y como se ha descrito, se inoculó con 10,8 mL de ese cultivo. Después de 30,5 h de tiempo de fermentación, se transfirieron 1,2 L del cultivo a un fermentador de producción. Este fermentador recibió un solo bolo de 16 mg de vitamina B₁₂, 1 h después de la inoculación. La concentración final de 1,3-propanodiol en una fermentación típica era de 114 g/L y el rendimiento era del 48%.

Muestras procedentes de una fermentación típica de 1.6btuR 1.6yqhD/pSYCO109 Triple se analizaron para estudiar la actividad enzimática de Pta. Una actividad específica de 0,4 U/mg de proteína fue obtenida. Muestras sometidas a ensayo de una fermentación típica de TT/pSYCO109, no mostraban una actividad enzimática detectable de Pta.

EJEMPLO 16ESTABILIDAD MEJORADA DEL RENDIMIENTO MOLAR EN LA CEPA TT/pSYCO109 COMPARADA CON 1.6btuR 1.6yqhD/pSYCO109 TRIPLE

Cultivos por duplicado de matraces de agitación se dejaron crecer con cepas btuR 1.6 yqhD Triple, pSYCO109 y TT pSYCO109. Después de incubar una colonia durante 10 h en LB + 50 mg/L de espectinomicina, 100 mL del cultivo se transfirieron a 30 mL de medio TM2 con 2% de glucosa, con o sin 50 ppm de espectinomicina (día 1). Para estudiar la estabilidad del rendimiento, un volumen de 100 mL de cultivos del día 1, se transfirieron después de 24 h a un volumen de nuevo aporte de 30 mL de medio TM2 que contenía 2% de glucosa, con o sin 50 ppm de espectinomicina. Esto se repitió 4 veces. El rendimiento molar se calculó como en el Ejemplo 2 al final de cada periodo de 24 h y los resultados se proporcionan más abajo en la Tabla 9. La delección de ackA-pta estabiliza el rendimiento molar, mejorando de este modo la producción de 1,3-propanodiol.

TABLA 9

Rendimiento molar

Cepa	Con (+) o sin (-) espectinomicina	Rendimiento molar Día 1	Rendimiento molar Día 2	Rendimiento molar Día 3	Rendimiento molar Día 4	Rendimiento molar Día 5
btuR, 1.6yqhD, pSYCO109 Triple	+	1,24	1,28	1,06	0,84	0,79
TT, pSYCO109	+	1,15	1,22	1,24	1,24	1,07
btuR 1.6yqhD, pSYCO109 Triple	-	1,23	1,04	0,95	0,61	0,25
TT, pSCO109	-	1,23	1,22	1,23	1,13	1,11

EJEMPLO 17CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *E. COLI* CON MUTACIONES POR DELECCIÓN EN LAS DES-HIDROGENASAS DE ALDEHÍDO MEDIANTE TRANSFORMACIÓN DEL ADN LINEAL

Una delección de *aldA* [para la referencia, véase GenBank, número de orden U00096] se realizó sustituyendo 1,3 kb de la región codificadora, por el casete FRT- CmR-FRT de pKD3. El casete se amplificó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:57 y SEQ ID NO:58 usando pKD3 como molde. El cebador SEQ ID NO:57 contiene 80 pb de homología con el extremo 5' de *aldA* y 20 pb de homología con el ADN molde, pKD3. El cebador SEQ ID NO:58 contiene 80 pb de homología con el extremo 3' de *aldA* y 20 pb de homología con pKD3. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se electroporaron en células competentes MG1655/pKD46. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 12,5 mg/L de cloranfenicol. La delección del gen *aldA* se confirmó por PCR, usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:59 y SEQ ID NO:60. La cepa de tipo silvestre proporcionó un producto de la PCR de 2,0 kb, mientras que la cepa recombinante proporcionó un producto de la PCR característico de 1,8 kb. Un material lisado de P1 de esa cepa se preparó y se utilizó para trasladar la mutación a la cepa TT para formar la cepa TT Δ aldA::Cm. El marcador de la resistencia al cloranfenicol se eliminó usando la recombinasa FLP (Datsenko y Wanner, *supra*) para crear TT *aldA*.

Una delección de *aldB* [para la referencia, véase GenBank, número de orden U00096] se realizó sustituyendo 1,5 kb de la región codificadora, por el casete FRT- CmR-FRT de pKD3. Un casete de sustitución se amplificó con la pareja de cebadores SEQ ID NO:61 y SEQ ID NO:62 usando pKD3 como molde. El cebador SEQ ID NO:61 contiene 80 pb de homología con el extremo 5' de *aldB* y 20 pb de homología con pKD3. El cebador SEQ ID NO:62 contiene 80 pb de homología con el extremo 3' de *aldB* y 20 pb de homología con pKD3. Los productos de la PCR se purificaron en gel y se electroporaron en células competentes MG1655/pKD46. Las cepas recombinantes se seleccionaron sobre placas LB con 12,5 mg/L de cloranfenicol. La delección del gen *aldB* se confirmó por PCR, usando la pareja de cebadores SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:64. La cepa de tipo silvestre proporcionó un producto de la PCR de 1,5 kb, mientras que la cepa recombinante proporcionó un producto de la PCR característico de 1,1 kb. Un

material lisado de P1 se preparó y se utilizó para trasladar la mutación a la cepa TT para formar la cepa TT Δ aldB::Cm. Un clon resistente al cloranfenicol se comprobó mediante PCR genómica con la pareja de cebadores SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:64 para asegurar que la mutación estaba presente.

EJEMPLO 17A

5 PRODUCCIÓN DE GLICEROL CON LA CEPA FMP' 1.5gap/pSYCO106

La cepa FMP' 1.5gapA se transformó con el plásmido pSYCO106. La producción de glicerol se determinó en fermentadores de 14 L, tal y como se ha descrito en los Métodos Generales con las siguientes diferencias en los parámetros de control para fermentación. Un vial congelado de FMP' 1.5gap/pSYCO106, descongelado se transfirió a 500 mL de SBG al 1% con 50 mg/L de espectinomicina, para preparar el precultivo. No se añadió vitamina B₁₂ al fermentador. Una fermentación típica daba como resultado la producción de 202 g/L de glicerol con un rendimiento molar del 115%.

EJEMPLO 17B

PRODUCCIÓN DE GLICEROL CON LA CEPA TT/pSYCO109

La producción de glicerol se determinó en fermentadores de 14 L, tal y como se ha descrito en los Métodos Generales con las siguientes diferencias en los parámetros de control para fermentación. Una colonia individual de TT/pSYCO109 sobre una placa LB con 50 mg/L de espectinomicina, se transfirió a 30 mL de LB con 100 mg/L de espectinomicina en un matraz de 250 mL. Cuando se alcanzó una DO₅₅₀ de aproximadamente 1 UA, se utilizaron 10,8 mL del cultivo para inocular un fermentador preparado tal y como se ha descrito. No se añadió vitamina B₁₂ al fermentador. Una fermentación típica daba como resultado la producción de 302 g/L de glicerol con un rendimiento molar del 137%.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> E.I. duPont de Nemours and Company Genencor International, Inc.

<120> PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE 1,3-PROPA-NODIOL CON ALTO RENDIMIENTO

25 <130> CL2180 PCT

<150> 60/416192

<151> 2002-10-04

<160> 68

<170> PatentIn, versión 3.1

30 <210> 1

<211> 1137

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia parcial de ADN del plásmido pLoxCat27 que comprende el casete LoxP-Cat-LoxP

<400> 1

ctcggatcca	ctagtaacgg	ccgccagtgt	gctggaattc	gcccttggcc	gcataacttc	60
gtatagtata	cattatacga	agttatctag	agttgcatgc	ctgcagggtcc	gaatttctgc	120
cattcatccg	cttattatca	cttattcagg	cgtagcacca	ggcgtttaag	ggcaccaata	180
actgccttaa	aaaaattacg	ccccgccctg	ccactcatcg	cagtactggt	gtaattcatt	240
aagcattctg	ccgacatgga	agccatcaca	aacggcatga	tgaacctgaa	tcgccagcgg	300
catcagcacc	ttgtcgctt	gcgtataata	tttgcccatg	gtgaaaacgg	gggcgaagaa	360
gttgtccata	ttggccacgt	ttaaatcaaa	actggtgaaa	ctcaccagg	gattggctga	420
gacgaaaaac	atattctcaa	taaaccctt	agggaaatag	gccaggttt	caccgtaaca	480
cgccacatct	tgcgaatata	tgtgtagaaa	ctgccggaaa	tcgtcgtggt	attcactcca	540
gagcgatgaa	aacgtttcag	tttgctcatg	gaaaacggtg	taacaaggt	gaacactatc	600
ccatatcacc	agctcacgt	ctttcattgc	catacggaat	tccggatgag	cattcatcag	660
gcgggcaaga	atgtgaataa	aggccggata	aaacttgtgc	ttatcttct	ttacggtctt	720

	taaaaaggcc gtaatatcca gctgaacggg ctgggttatag gtaacattgag caactgactg	780
	aaatgcctca aaatgttctt tacgatgccca ttgggatata tcaacgggtgg tatatccagt	840
	gatttttttc tccatttttag cttccttagc tcctgaaaat ctcgataact caaaaaatac	900
	gcccggtagt gatcttattt cattatgggtg aaagttggaa cctcttacgt gccgatcaac	960
	gtctcatttt cgccaaaagt tggcccaggg cttcccggta tcaacaggga caccaggatt	1020
	tatttattct gcgaagtgat cttccgtcac aggtatttat tcggactcta gataacttcg	1080
	tatagtatac attatacgaa gttatgaagg gcgaattctg cagatatcca tcacact	1137
	<210> 2	
	<211> 61	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador ArcA1	
	<400> 2	
	cacattctta tcgttgaaga cgagttggta acacgcaaca cgtgtaggct ggagctgctt	60
	c	61
10	<210> 3	
	<211> 62	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador ArcA2	
	<400> 3	
	ttccagatca ccgcagaagc gataaccttc accgtgaatg gtcatatgaa tatkctcctt	60
	ag	62
	<210> 4	
	<211> 24	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador ArcA3	
	<400> 4	
25	agttggtaac acgcaacacg caac	24
	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador ArcA4

<400> 5

5 cgcagaagcg ataacctca ccg 23

<210> 6

<211> 1320

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia parcial de ploxcat1 que comprende el casete lox-cat-loxP

<400> 6

aagcttaagg tgcacggccc acgtggccac tagtacttct cgaggctcgac ggtatcgata	60
agctggatcc ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatctagag tccgaataaa	120
tacctgtgac ggaagatcac ttcgcagaat aaataaatcc tgggtgtccct gttgataccg	180
ggaagccctg ggccaacttt tggcgaaaat gagacggtga tcggcacgta agaggttcca	240
actttcacca taatgaaata agatcactac cgggcgtatt ttttgagtta tcgagatttt	300
caggagctaa ggaagctaaa atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat	360
ccaatggca tcgtaaagaa cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata	420
accagaccgt tcagctggat attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca	480
agttttatcc ggcctttatt cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc	540
gtatggcaat gaaagacggt gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg	600
ttttccatga gcaaaactgaa acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc	660
ggcagtttct acacatatat tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt	720
tccctaaagg gtttattgag aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca	780
ccagttttga tttaaacgtg gccaatatgg acaacttctt cggccccgtt ttcaccatgg	840
gcaaataatta tacgcaaggc gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg	900
ccgtttgtga tggcttccat gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcatg	960

agtggcaggg cggggcgtaa tttttttaag gcagttattg gtgcccttaa acgcctggtg	1020
ctacgcctga ataagtgata ataagcggat gaatggcaga aattcggacc tgcaggcatg	1080
caactctaga taacttcgta taatgtatgc tatacgaagt tatgcggccg ccatatgcat	1140
cctaggccta ttaatatcc ggagtatacg tagccggcta acgttctagc atgcgaaatt	1200
taaagcgctg atatcgatcg cgcgcatgc tgtcatgatg atcattgcaa ttggatccat	1260
atatagggcc cgggggttata attacctcag gtcgacgtcc catggccatt gaattcgtaa	1320

<210> 7

	<211> 61		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Cebador GalA		
	<400> 7		
	tcggttttca cagttgttac atttcttttc agtaaagtct ggatgcatat ggcggccgca	60	
	t	61	
	<210> 8		
	<211> 65		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador GalP2		
	<400> 8		
	catgatgccc tccaatatgg ttatttttta ttgtgaatta gtctgtttcc tgtgtgaaat	60	
15	tgta	65	
	<210> 9		
	<211> 60		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador GlkA		
	<400> 9		
	acttagtttg cccagcttgc aaaaggcatc gctgcaattg gatgcatatg gcggccgcat	60	
	<210> 10		
25	<211> 67		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador Glk2		
30	<400> 10		
	cattcttcaa ctgctccgct aaagtcaaaa taattctttc tcgtctgttt cctgtgtgaa	60	
	attgtta	67	
	<210> 11		
	<211> 1270		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		

<220>

<223> "Inserto" del casete LoxP-cat-loxP

<400> 11

```

ggatgcatat ggcgccgca taacttcgta tagcatacat tatacgaagt tatctagagt      60
tgcattgctg caggctcgaa tttctgcat tcatccgctt attatcactt attcaggcgt      120
agcaccaggc gttaagggc accaataact gccttaaaaa aattacgccc cgccctgcc      180
ctcatcgag tactgttgta attcattaag cattctgccg acatggaagc catcacaac      240
ggcatgatga acctgaatcg ccagcggcat cagcaccttg tcgccttgcg tataatattt      300
gcccattgtg aaaacggggg cgaagaagtt gtccatattg gccacgttta aatcaaaact      360
ggtgaaactc acccagggat tggctgagac gaaaaacata ttctcaataa accctttagg      420
gaaataggcc aggttttcac cgtaacacgc cacatcttgc gaatatatgt gtagaaactg      480
ccggaaatcg tcgtggtatt cactccagag cgatgaaaac gtttcagttt gctcatggaa      540
aacggtgtaa caagggtgaa cactatccca tatcaccagc tcaccgtctt tcattgccat      600
acggaattcc ggatgagcat tcatcaggcg ggcaagaatg tgaataaagg ccggataaaa      660
cttgtgctta tttttcttta cggctcttta aaaggccgta atatccagct gaacgggtctg      720
gttataggta cattgagcaa ctgactgaaa tgctcaaaa tgttctttac gatgccattg      780
ggatatatca acggtggtat atccagtgat tttttctcc attttagctt ccttagctcc      840
tgaaaatctc gataactcaa aaaatacgcc cggtagtgat cttatttcat tatggtgaaa      900
gttggaaact cttacgtgcc gatcaacgtc tcattttcgc caaaagttgg ccaggggctt      960

```

```

cccgtatca acagggacac caggatttat ttattctgcg aagtgatctt ccgtcacagg      1020
tatttattcg gactctagat aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt atggatcatg      1080
gctgtgcagg tcgtaaatca ctgcataatt cgtgtcgctc aaggcgact cccgttctgg      1140
ataatgtttt ttgcgccgac atcataacgg ttctggcaaa tattctgaaa tgagctgttg      1200
acaattaatc atccggctcg tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca      1260
ggaaacagac                                     1270

```

5 <210> 12

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador GalB1

<400> 12

```
actttggtcg tgaacattc ccgtgggaaa      30
```

<210> 13

<211> 28

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador Galc11
 <400> 13
 5 agaaagataa gcaccgagga tcccgata 28
 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador GlkB1
 <400> 14
 aacaggagtg ccaaacagtg cgccga 26
 <210> 15
 15 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador GlkC11
 20 <400> 15
 ctattcggcg caaaatcaac gtgaccgcct 30
 <210> 16
 <211> 99
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador edd1
 < 400> 16
 atgaatccac aattgttacg cgtaacaaat cgaatcattg aacgttcgcg cgagactcgc 60
 tctgcttatac tcgcccggat ttatcgataa gctggatcc 99
 30 <210> 17
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador edd2
 <400> 17

	ttāāāāagtg atacaggttg cgccctgttc ggcaccggac agtttttcac gcaaggcgct	60
	gaataattca cgtcctgtcg gatgcatatg gcggccgc	98
	<210> 18	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador edd3	
	<400> 18	
	taacatgac ttgcgcagat tg	22
10	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador edd4	
	<400> 19	
	actgcacact cggtacgcag a	21
	<210> 20	
	<211> 29	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> CN1 que codifica el promotor mutado trc que dirige la expresión de glk	
	<400> 20	
25	ctgacaatta atcatccggc tcgtataat	29
	<210> 21	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> CN2 que codifica el promotor progenitor trc	
	<400> 21	
	ttgacaatta atcatccggc tcgtataat	29
	<210> 22	
35	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Cebador gapA1
 <400> 22
 atgaccatct gaccatttgt gtcaa 25
 5 <210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cebador gapA2
 <400> 23
 aatgcgctaa cagcgtaaag tcgtg 25
 <210> 24
 <211> 35
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador gapA3
 <400> 24
 gatacctact ttgatagtca catattccac cagct 35
 20 <210> 25
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador gapA4
 <400> 25
 agctggtgga atatgtgact atcaaagtag gtatc 35
 <210> 26
 <211> 35
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador gapA5
 <400> 26
 35 gatacctact ttgatagtca aatattccac cagct 35
 <210> 27
 <211> 35

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador gapA6
 5 <400> 27
 agctggtgga atatttgact atcaaagtag gtatc 35
 <210> 28
 <211> 42
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> promotor corto 1.5 GI
 <400> 28
 gcccttgact atgccacatc ctgagcaaat aattcaacca ct 42
 15 <210> 29
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador gapA-R1
 <400> 29
 agtcatatat tccaccagct atttgttagt gaataaaaagt ggttgaatta tttgctcagg 60
 atgtggcata gtcaagggca tatgaatatc ctccttag 98
 <210> 30
 <211> 80
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador gapA-R2
 <400> 30
 gctcacatta cgtgactgat tctaacaaaa cattaacacc aactggcaaa attttgtccg 60
 30 tgtaggctgg agctgcttcg 80
 <210> 31
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador corto 1.20 GI

<400> 31
 gcccttgacg atgccacatc ctgagcaa at aattcaacca ct 42
 <210> 32
 <211> 42
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador corto 1.6 GI
 <400> 32
 10 gcccttgaca atgccacatc ctgagcaa at aattcaacca ct 42
 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador gapA-R3
 <400> 33
 gtcgacaaaac gctggtatac ctca 24
 <210> 34
 20 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador gapA-R4
 25 <400> 34
 agtcatatat tccaccagct atttgttagt gaataaaaagt gggtgaatta ttgctcagg 60
 atgtggcatc gtcaaggga tatgaatatc ctccttag 98
 <210> 35
 <211> 98
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador gapA-R5
 <400> 35
 agtcatatat tccaccagct atttgttagt gaataaaaagt gggtgaatta ttgctcagg 60
 atgtggcatt gtcaaggga tatgaatatc ctccttag 98
 35 <210> 36
 <211> 60

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador msgA-1
 5 <400> 36
 gtacattatg gaactgacga ctgcacttt acctgcgcgg ttaggctgg agctgctcg 60
 <210> 37
 <211> 60
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador msgA-2
 <400> 37
 cttcagacgg tccgcgagat aacgctgata atcggggatc catatgaata tctccttag 60
 15 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador msgA-3
 <400> 38
 cttgaattgt tggatggcga tg 22
 <210> 39
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador msgA-4
 <400> 39
 30 cgtcacgtta ttggatgaga g 21
 <210> 40
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador PppcF
 <400> 40

cgatttttta acatttccat aagttacgct tatttaaagc gtcgtgaatt taatgacgta 60
aatccctgct atttattcgt gtgtaggctg gagctgcttc 100
<210> 41
<211> 100
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador PppcR
<400> 41
tcgcattggc gcgaatatgc tcgggctttg cttttcgtca gtggttgaat tatttgctca 60
ggatgtggca ttgtcaaggg catatgaata tcctccttag 100
10 <210> 42
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Cebador SeqppcR7
<400> 42
gcggaatatt gttcgttcat attaccccag 30
<210> 43
<211> 90
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador 3G144
<400> 43
ccaggctgat tgaaatgccc ttctgtttca ggcataaagc cccaaagtca taaagtacac 60
25 tggcagcgcg gtgtaggctg gagctgcttc 90
<210> 44
<211> 93
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> Cebador 3G145
<400> 44
gcatggctac tcctcaacga cgttgtctgt tagtggttga attatttgct caggatgtgg 60
cattgtcaag ggcattccgg ggatccgctg acc 93
<210> 45

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador YCIKUp
 <400> 45
 gataataccg cgttcacacct gggcc 25
 <210> 46
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador YCIKDn
 <400> 46
 15 gcgagttcac ttcattggcg tccat 25
 <210> 47
 <211> 98
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador yqhCFRTF
 <400> 47
 ttaattcccc tgcattgccc gcattcttgc cgcattctcc cccggcgtca caccgaagta 60
 acgttttaaac tcacggctgt gtaggctgga gctgcttc 98
 <210> 48
 25 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador CyqhD1.6
 30 <400> 48
 ctcccttgct gggccaatat gagggcagag aacgatctgc ctggttgaat tatttgctca 60
 ggatgtggca ttgtcaaggc catatgaata tcctccttag 100
 <210> 49
 <211> 46
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador yqhBF
 <400> 49
 atcgcccgca ttcttgccgc atcttcccc ggcgtcacac cgaagt 46
 <210> 50
 5 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador pta 1
 10 <400> 50
 atgtcgagta agttagtact ggttctgaac tgcggtagtt cttcactgaa atttgccatc 60
 atcgatgcag taaatgggtga tgtgtaggct ggagctgctt 100
 <210> 51
 <211> 100
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador ack-pta 2
 <400> 51
 ttactgctgc tgtgcagact gaatcgcagt cagcgcgatg gtgtagacga tatcgtcaac 60
 cagtgcgcca cgggacaggt catatgaata tcctccttag 100
 20 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador ack-U
 <400> 52
 attcattgag tcgtcaaatt 20
 <210> 53
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador ack-D
 <400> 53
 35 attgcggaca tagcgcaaat 20
 <210> 54

<211> 98
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador ptsHFRT1
 <400> 54
atgttccagc aagaagttac cattaccgct ccgaacggc tgcacaccg ccctgctgcc 60
cagtttgtaa aagaagctgt gtaggctgga gctgcttc 98
 <210> 55
 <211> 97
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador crrFRT11
 <400> 55
ttacttcttg atgcggataa ccgggggttc acccacgggt acgctaccg acagtttgat 60
cagttctttg atttcgtcat atgaatatcc tccttag 97
 <210> 56
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador crrR
 <400> 56
cctgtttgt gtcagctca tcagtggtt gctgaa 36
 <210> 57
 25 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador DaldAF
 30 <400> 57
atgtcagtac ccgttcaaca tcctatgtat atcgatggac agtttggttac ctggcgtgga 60
gacgcatgga ttgatgtggt tgtgtaggct ggagctgctt 100
 <210> 58
 <211> 100
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador DaldAR
 <400> 58
 ttaagactgt aaataaacca cctgggtctg cagatattca tgcaagccat gtttaccatc 60
 tgcgccgcca ataccggatt catatgaata tcctccttag 100
 <210> 59
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aldAF300
 10 <400> 59
 ttatcgttca cgttgattt 20
 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aldAR300
 <400> 60
 gaaaaaagtg actgccgaag 20
 20 <210> 61
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador DaldBF
 <400> 61
 cgtctaccct tgttatacct cacaccgcaa ggagacgatc atgaccaata atcccccttc 60
 agcacagatt aagcccggcg gtgtaggctg gagctgcttc 100
 <210> 62
 <211> 100
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador DaldBR
 <400> 62
 gcatcaggca atgaataccc aatgcgacca gcttcttata tcagaacagc cccaacggtt 60
 35 tatccgagta gctcaccagc catatgaata tcctccttag 100

<210> 63
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador aldBF
 <400> 63
 atgaccaata atcccccttc ag 22
 <210> 64
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aldBR
 15 <400> 64
 gcttcttata tcagaacagc c 21
 <210> 65
 <211> 13669
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Plásmido pSYCO101
 <400> 65
 tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga 60
 taacaagaaa aagccagcct ttcattgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc 120
 acgcttaaaa ataataaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc 180
 ttagtgcatt taacgcttga gtttaagccgc gccgcgaagc ggcgtcggct tgaacgaatt 240
 gtttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct 300
 tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta 360
 gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgct _ccattgcca gtcggcagcg 420

acatccttcg	gcgcgatfff	gccggttact	gcgctgtacc	aaatgcggga	caacgtaagc	480
actacatttc	gctcatcgcc	agcccagtcg	ggcggcgagt	tccatagcgt	taaggtttca	540
tttagcgcct	caaatagatc	ctgttcagga	accggatcaa	agagttcctc	cgccgctgga	600
cctaccaagg	caacgctatg	ttctcttgct	tttgtcagca	agatagccag	atcaatgtcg	660
atcgtggctg	gctcgaagat	acctgcaaga	atgtcattgc	gctgccattc	tccaaattgc	720
agttcgcgct	tagctggata	acgccacgga	atgatgtcgt	cgtgcacaac	aatggtgact	780
tctacagcgc	ggagaatctc	gctctctcca	ggggaagccg	aagtttcaa	aaggctggtg	840
atcaaagctc	gccgcgttgt	ttcatcaagc	cttacggtca	ccgtaaccag	caaatacaata	900
tcactgtgtg	gcttcaggcc	gccatccact	gcggagccgt	acaaatgtac	ggccagcaac	960
gtcggttcga	gatggcgctc	gatgacgcca	actacctctg	atagttgagt	cgatacttcg	1020
gcgatcaccg	cttccctcat	gatgtttaac	tttgttttag	ggcgactgcc	ctgctgcgta	1080
acatcgttgc	tgctccataa	catcaaacat	cgaccacggg	cgtaacgcgc	ttgctgcttg	1140
gatgcccag	gcatagactg	tacccccaaa	aaacagtcac	aacaagccat	gaaaaccgcc	1200
actgcgccgt	taccaccgct	gcgttcggtc	aaggttctgg	accagttgcg	tgagcgcata	1260
cgctacttgc	attacagctt	acgaaccgaa	caggcttatg	tccactgggt	tcgtgccttc	1320
atccgtttcc	acggtgtgcg	tcacccggca	accttgggca	gcagcgaagt	cgaggcattt	1380
ctgtcctggc	tggcgaacga	gcgcaagggt	tcggctctcca	cgcatcgtca	ggcattggcg	1440
gccttgctgt	tcttctacgg	caagggtgctg	tgcacggatc	tgccctggct	tcaggagatc	1500
ggaagacctc	ggccgtcgcg	gcgcttgccg	gtggtgctga	ccccggatga	agtggttcgc	1560
atcctcggtt	ttctggaagg	cgagcatcgt	ttgttcgccc	agcttctgta	tggaacgggc	1620
atgcggatca	gtgaggggtt	gcaactgcgg	gtcaaggatc	tggatttcga	tcacggcacg	1680
atcatcgtgc	gggagggcaa	gggctccaag	gatcgggcct	tgatgttacc	cgagagcttg	1740
gcacccagcc	tgcgcgagca	ggggaattaa	ttcccacggg	ttttgctgcc	cgcaaacggg	1800
ctgttctggg	gttgctagtt	tggtatcaga	atcgcagatc	cggcttcagc	cggtttgccg	1860
gctgaaagcg	ctatttcttc	cagaattgcc	atgatttttt	ccccacggga	ggcgtcactg	1920
gctcccggtg	tgctggcagc	tttgattcga	taagcagcat	cgcctgtttc	aggctgtcta	1980
tgtgtgactg	ttgagctgta	acaagttgtc	tcagggtgttc	aatttcatgt	tctagttgct	2040
ttgttttact	ggtttcacct	gttctattag	gtgttacatg	ctgttcacat	gttacattgt	2100
cgatctgttc	atggtgaaca	gctttgaatg	cacaaaaaac	tcgtaaaagc	tctgatgtat	2160
ctatcttttt	tacaccgttt	tcatctgtgc	atatggacag	ttttcccttt	gatatgtaac	2220
ggtgaacagt	tgttctactt	ttgtttgtta	gtcttgatgc	ttcactgata	gatacaagag	2280
ccataagaac	ctcagatcct	tccgtattta	gccagtatgt	tctctagtgt	ggttcgttgt	2340
ttttgcgtga	gcatgagaa	cgaaccattg	agatcatact	tactttgcat	gtcactcaaa	2400
aattttgcct	caaaactggg	gagctgaatt	tttgcagtta	aagcatcgtg	tagtggtttt	2460

cttagtccgt	tatgtaggta	ggaatctgat	gtaatggttg	ttggtatfff	gtcaccattc	2520
atfffftatct	ggttggtctc	aagttcgggt	acgagatcca	tttgtctatc	tagttcaact	2580
tggaaaatca	acgtatcagt	cgggcggcct	cgcttatcaa	ccaccaatff	catattgctg	2640
taagtgttta	aatctttact	tattggtttc	aaaacccatt	ggttaagcct	tttaaactca	2700
tggtagttat	tttcaagcat	taacatgaac	ttaaattcat	caaggctaaf	ctctatattf	2760
gccttgtag	ttttcttttg	tgtagttct	tttaataacc	actcataaat	cctcatagag	2820
tatttgffff	caaaagactt	aacatgttcc	agattatatt	ttatgaatff	ttttaactgg	2880
aaaagataag	gcaatatctc	ttcactaaaa	actaattcta	atfffftcgt	tgagaacttg	2940
gcatagtttg	tccactggaa	aatctcaaag	cctttaacca	aaggattcct	gatttccaca	3000
gttctcgtca	tcagctctct	ggttgcttta	gctaatacac	cataagcatt	ttccctactg	3060
atgttcatca	tctgagcgta	ttggttataa	gtgaacgata	ccgtccgttc	tttcttgta	3120
gggttttcaa	tcgtgggggt	gagtagtgcc	acacagcata	aaattagctt	ggtttcatgc	3180
tccgttaagt	catagcgact	aatcgctagt	tcatttgctt	tgaaaacaac	taattcagac	3240
atacatctca	attggtctag	gtgattttaa	tcactatacc	aattgagatg	ggctagtcaa	3300
tgataattac	tagtcctfff	cctttgagtt	gtgggtatct	gtaaattctg	ctagaccttt	3360
gctggaaaac	ttgtaaattc	tgctagacct	tctgtaaatt	ccgctagacc	tttgtgtgtt	3420
ttttttgttt	atattcaagt	ggttataaatt	tatagaataa	agaaagaata	aaaaaagata	3480
aaaagaatag	atcccagccc	tgtgtataac	tcactactff	agtcagttcc	gcagtattac	3540
aaaaggatgt	cgcaaacgct	gtttgctcct	ctacaaaaca	gaccttaaaa	ccctaaaggc	3600
ttaagtagca	ccctcgcaag	ctcgggcaaa	tcgctgaata	ttccttttgt	ctccgaccat	3660
caggcacctg	agtcgctgtc	tttttcgtga	cattcagttc	gctgcgctca	cggctctggc	3720
agtgaatggg	ggtaaatggc	actacaggcg	ccttttatgg	attcatgcaa	ggaaactacc	3780
cataatacaa	gaaaagcccg	tcacgggctt	ctcagggcgt	tttatggcgg	gtctgctatg	3840
tggtgctatc	tgactttttg	ctgttcagca	gttcctgccc	tctgattttc	cagtctgacc	3900
acttcggatt	atcccgtgac	aggtcattca	gactggctaa	tgacccaggt	aaggcagcgg	3960
tatcatcaac	aggcttacct	gtcttactgt	cgggaattca	tttaaatagt	caaaagcctc	4020
cgaccggagg	cttttgactg	ctaggcgatc	tgtgctgttt	gccacggtat	gcagcaccag	4080
cgcgagatta	tgggctcgca	cgctcgactg	tcggacgggg	gactggaac	gagaagtcag	4140
gcgagccgtc	acgcccttga	caatgccaca	tcctgagcaa	ataattcaac	cactaaacaa	4200
atcaaccgcg	tttcccggag	gtaaccaagc	ttgcgggaga	gaatgatgaa	caagagccaa	4260
caagttcaga	caatcacctt	ggccgccgcc	cagcaaattg	cggcggcggt	ggaaaaaaa	4320
gccactgaga	tcaacgtggc	ggtggtgttt	tccgtagttg	accgcggagg	caacacgctg	4380
cttatccagc	ggatggacga	ggccttcgtc	tccagctgcg	atatttccct	gaataaagcc	4440
tggagcgcct	gcagcctgaa	gcaaggtagc	catgaaatta	cgtagcgggt	ccagccagga	4500
caatctctgt	acggtctgca	gctaaccaac	caacagcgaa	ttattatfff	tggcggcggc	4560

ctgccagtta	tttttaatatga	gcaggtaatt	ggcgccgctcg	gcgttagcgg	cggtacggtc	4620
gagcaggatc	aattatttagc	ccagtgcgcc	ctggattgtt	tttccgcatt	ataacctgaa	4680
gcgagaaggt	atattatgag	ctatcgtatg	ttccgccagg	cattctgagt	gttaacgagg	4740
ggaccgtcat	gtcgttttca	ccgccaggcg	tacgcctgtt	ttacgatccg	cgcgggcacc	4800
atgccggcgc	catcaatgag	ctgtgctggg	ggctggagga	gcaggggggtc	ccctgccaga	4860
ccataaccta	tgacggaggc	ggtgacgccg	ctgcgctggg	cgccctggcg	gccagaagct	4920
cgcccctgcg	ggtgggtatc	gggctcagcg	cgtccggcga	gatagccctc	actcatgccc	4980
agctgccggc	ggacgcgccg	ctggctaccg	gacacgtcac	cgatagcgac	gatcaactgc	5040
gtacgctcgg	cgccaacgcc	gggcagctgg	ttaaagtcct	gccgttaagt	gagagaaact	5100
gaatgtatcg	tatctataacc	cgcaccgggg	ataaaggcac	caccgccctg	tacggcggca	5160
gccgcatcga	gaaagaccat	attcgcgtcg	aggcctacgg	caccgtcgat	gaactgatat	5220
cccagctggg	cgtctgttac	gccacgacct	gcgacgccgg	gctgcgggaa	agcctgcacc	5280
atattcagca	gacgctgttc	gtgctggggg	ctgaactggc	cagcgatgcg	cggggcctga	5340
cccgcctgag	ccagacgata	ggcgaagagg	agatcacccg	cctggagcgg	cttatcgacc	5400
gcaatatggc	cgagagcggc	ccgttaaaaac	agttcgtgat	cccggggagg	aatctcgctt	5460
ctgcccagct	gcacgtggcg	cgcacccagt	cccgtcggct	cgaacgcctg	ctgacggcca	5520
tggaccgcgc	gcatccgctg	cgcgacgcgc	tcaaacgcta	cagcaatcgc	ctgtcggatg	5580
ccctgttctc	catggcgcgga	atcgaagaga	ctaggcctga	tgcttgcgct	tgaactggcc	5640
tagcaaacac	agaaaaaagc	ccgcacctga	cagtgcgggc	tttttttttc	ctaggcgatc	5700
tgtgctgttt	gccacggtat	gcagcaccag	cgcgagatta	tgggctcgca	cgctcgactg	5760
tcggacgggg	gactggaac	gagaagtcag	gcgagccgtc	acgcccttga	caatgccaca	5820
tcctgagcaa	ataattcaac	cactaaacaa	atcaaccgcg	tttcccggag	gtaaccaagc	5880
ttcacctttt	gagccgatga	acaatgaaaa	gatcaaaacg	atttgagta	ctggcccagc	5940
gccccgtcaa	tcaggacggg	ctgattggcg	agtggcctga	agaggggctg	atgccatgg	6000
acagccccct	tgacccgggtc	tcttcagtaa	aagtggacaa	cggtctgatc	gtcgaactgg	6060
acggcaaacg	ccgggaccag	tttgacatga	tcgaccgatt	tatcgccgat	tacgcgatca	6120
acgttgagcg	cacagagcag	gcaatgcgcc	tggaggcggt	ggaaatagcc	cgtatgctgg	6180
tggatattca	cgtcagccgg	gaggagatca	ttgccatcac	taccgccatc	acgccggcca	6240
aagcggtcga	ggtgatggcg	cagatgaacg	tgggtggagat	gatgatggcg	ctgcagaaga	6300
tgcgtgcccc	ccggaccccc	tccaaccagt	gccacgtcac	caatctcaaa	gataatccgg	6360
tgcagattgc	cgctgacgcc	gccgaggccg	ggatccgcgg	cttctcagaa	caggagacca	6420
cggctcggat	cgcgcgctac	gcgccgttta	acgccctggc	gctgttggtc	ggttcgcagt	6480
gcggccgccc	cggcgtgttg	acgcagtgct	cgggtggaaga	ggccaccgag	ctggagctgg	6540
gcatgcgtgg	cttaaccagc	tacgccgaga	cgggtgctgg	ctacggcacc	gaagcggtat	6600

ttaccgacgg	cgatgatacg	ccgtgggtcaa	aggcgttcct	cgcctcggcc	tacgcctccc	6660
gcgggttgaa	aatgcgctac	acctccggca	ccggatccga	agcgctgatg	ggctattcgg	6720
agagcaagtc	gatgctctac	ctcgaatcgc	gctgcatctt	cattactaaa	ggcgccgggg	6780
ttcagggact	gcaaaacggc	gcggtgagct	gtatcggcat	gaccggcgct	gtgccgtcgg	6840
gcattcgggc	ggtgctggcg	gaaaacctga	tcgcctctat	gctcgacctc	gaagtggcgt	6900
ccgccaacga	ccagactttc	tcccactcgg	atattcgccg	caccgcgcgc	accctgatgc	6960
agatgctgcc	gggcaccgac	tttattttct	ccggctacag	cgcggtgccg	aactacgaca	7020
acatgttcgc	cggctcgaac	ttcgatgcgg	aagattttga	tgattacaac	atcctgcagc	7080
gtgacctgat	ggttgacggc	ggcctgcgtc	cggtgaccga	ggcggaacc	attgccattc	7140
gccagaaagc	ggcgcgggcg	atccaggcgg	ttttccgcga	gctggggctg	ccgccaatcg	7200
ccgacgagga	ggtggaggcc	gccacctacg	cgcacggcag	caacgagatg	ccgccgcgta	7260
acgtggtgga	ggatctgagt	gcggtggaag	agatgatgaa	gcgcaacatc	accggcctcg	7320
atattgtcgg	cgcgctgagc	cgcagcggct	ttgaggatat	cgccagcaat	attctcaata	7380
tgctgcgcca	gcgggtcacc	ggcgattacc	tgacagacctc	ggccattctc	gatcggcagt	7440
tcgaggtggt	gagtgcggtc	aacgacatca	atgactatca	ggggccgggc	accggctatc	7500
gcatctctgc	cgaacgctgg	gcggagatca	aaaatattcc	gggcgtgggt	cagcccagaca	7560
ccattgaata	aggcgggtatt	cctgtgcaac	agacaaccca	aattcagccc	tcttttacct	7620
tgaaaacccg	cgagggcggg	gtagcttctg	ccgatgaacg	cgccgatgaa	gtggtgatcg	7680
gcgtcggccc	tgcttctgat	aaacaccagc	atcacactct	gatcgatatg	ccccatggcg	7740
cgatcctcaa	agagctgatt	gccgggggtg	aagaagaggg	gcttcacgcc	cgggtggtgc	7800
gcattctgcg	cacgtccgac	gtctccttta	tggcctggga	tgcggccaac	ctgagcggct	7860
cggggatcgg	catcggtatc	cagtcgaagg	ggaccacggt	catccatcag	cgcgatctgc	7920
tgccgctcag	caacctggag	ctgttctccc	aggcgccgct	gctgacgctg	gagacctacc	7980
ggcagattgg	caaaaacgct	gcgcgctatg	cgcgcaaaga	gtcaccttcg	ccggtgccgg	8040
tggtgaacga	tcagatggtg	cggccgaaat	ttatggccaa	agccgcgcta	tttcatatca	8100
aagagaccaa	acatgtggtg	caggacgccc	agcccgtcac	cctgcacatc	gacttagtaa	8160
gggagtgacc	atgagcgaga	aaaccatgcg	cgtgcaggat	tatccgttag	ccaccgctg	8220
cccggagcat	atcctgacgc	ctaccggcaa	accattgacc	gatattacct	tcgagaaggt	8280
gctctctggc	gaggtgggccc	cgcaggatgt	gcggatctcc	cgccagaccc	ttgagtacca	8340
ggcgagatt	gccgagcaga	tgacgcgcca	tgcggtggcg	cgcaatttcc	gccgcgcggc	8400
ggagcttatc	gccattcctg	acgagcgcac	tctggctatc	tataacgcgc	tgcgcccgtt	8460
ccgctcctcg	caggcggagc	tgctggcgat	cgccgacgag	ctggagcaca	cctggcatgc	8520
gacagtgaat	gccgcctttg	tccggggagtc	ggcggaagtg	tatcagcagc	ggcataagct	8580
gcgtaaagga	agctaagcgg	aggtcagcat	gccgttaata	gccgggattg	atatcggcaa	8640
cgccaccacc	gaggtggcgc	tggcgtccga	ctaccgcgag	gcgagggcgt	ttgttgccag	8700

cgggatcgtc	gcgacgacgg	gcatgaaagg	gacgcgggac	aatatcgccg	ggaccctcgc	8760
cgcgctggag	caggccctgg	cgaaaacacc	gtggtc gatg	agcgatgtct	ctcgcatcta	8820
tcttaacgaa	gccgcgccgg	tgattggcga	tgtggcgatg	gagaccatca	ccgagaccat	8880
tatcaccgaa	tcgaccatga	tcggtcataa	cccgcagacg	ccgggcgggg	tgggcgttgg	8940
cgtggggacg	actatcgccc	tcgggcggct	ggcgacgctg	ccggcgggcg	agtatgccga	9000
ggggtggatc	gtactgattg	acgacgccgt	cgatttcctt	gacgccgtgt	ggtggctcaa	9060
tgaggcgctc	gaccggggga	tcaacgtggg	ggcggcgatc	ctcaaaaagg	acgacggcgt	9120
gctggtgaac	aaccgcctgc	gtaaaaccct	gccggtggtg	gatgaagtga	cgctgctgga	9180
gcagggtcccc	gagggggtaa	tggcgggcgg	ggaagtggcc	gcgccggggc	aggtggtgcg	9240
gatcctgtcg	aatccctacg	ggatcgccac	cttcttcggg	ctaagcccgg	aagagacca	9300
ggccatcgtc	cccacgccc	gcgccctgat	tggcaaccgt	tccgcggtgg	tgctcaagac	9360
cccgcagggg	gatgtgcagt	cgcggtgat	cccggcgggc	aacctctaca	ttagcggcga	9420
aaagcgccgc	ggagaggccg	atgtcgccga	gggcgcggaa	gccatcatgc	aggcgatgag	9480
cgctgcgct	ccggtacgcg	acatccgcgg	cgaaccgggc	accacgccc	gcggcatgct	9540
tgagcgggtg	cgcaaggtaa	tggcgctcct	gaccggccat	gagatgagcg	cgatatacat	9600
ccaggatctg	ctggcggtgg	atacgtttat	tccgcgcaag	gtgcagggcg	ggatggccgg	9660
cgagtgcgcc	atggagaatg	ccgtcgggat	ggcggcgatg	gtgaaagcgg	atcgtctgca	9720
aatgcagggt	atcgcccgcg	aactgagcgc	ccgactgcag	accgaggtgg	tgggtggcgg	9780
cgtggaggcc	aacatggcca	tcgccggggc	gttaaccact	cccggctgtg	cggcgccgct	9840
ggcgatcctc	gacctcggcg	ccggctcgac	ggatgcggcg	atcgtcaacg	cggaggggca	9900
gataacggcg	gtccatctcg	ccggggcggg	gaatatggtc	agcctgttga	ttaaaaccga	9960
gctgggctc	gaggatcttt	cgctggcgga	agcgataaaa	aaatacccgc	tggccaaagt	10020
ggaaagcctg	ttcagtattc	gtcacgagaa	tggcgcggtg	gagttctttc	gggaagccct	10080
cagcccggcg	gtgttcgcca	aagtgggtgta	catcaaggag	ggcgaactgg	tgccgatcga	10140
taacgccagc	ccgctggaaa	aaattcgtct	cgtgcgccgg	caggcgaaag	agaaagtgtt	10200
tgtcaccaac	tgctgcgcg	cgctgcgcca	ggtctcacc	ggcggttcca	ttcgcatat	10260
cgcctttgtg	gtgctggtgg	gcggctcatc	gctggacttt	gagatcccgc	agcttatcac	10320
ggaagccttg	tcgcactatg	gcgtggtcgc	cgggcagggc	aatattcggg	gaacagaagg	10380
gccgcgcaat	gcggtcgcca	ccgggtgct	actggccggg	caggcggaatt	aaacgggcgc	10440
tcgcgccagc	ctctaggtac	aaataaaaaa	ggcacgtcag	atgacgtgcc	ttttttcttg	10500
tctagagtac	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagtgggt	aacgccaggg	10560
ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgaat	tcgagctcgg	taccggggc	10620
ggccgcgcta	gcgcccgatc	cagctggagt	ttgtagaaac	gcaaaaaggc	catccgtcag	10680
gatggccttc	tgcttaattt	gatgcctggc	agtttatggc	gggcgtcctg	cccgccaccc	10740

tccgggcccgt tgccttcgcaa cgttcaaadc cgctcccggc ggatttgtcc tactcaggag 10800
 agcgttcacc gacaaacaac agataaaacg aaaggcccag tctttcgact gagcctttcg 10860
 ttttatttga tgcctggcag ttccctactc tcgcatgggg agaccccaca ctaccatcgg 10920
 cgctacggcg tttcacttct gagttcggca tggggtcagg tgggaccacc gcgctactgc 10980
 cgccaggcaa attctgtttt atcagaccgc ttctgcgttc tgatttaatc tgtatcaggc 11040
 tgaaaatctt ctctcatccg ccaaaacagc caagcttgca tgcctgcagc ccgggttacc 11100
 atttcaacag atcgtcctta gcatataagt agtcgtcaaa aatgaattca acttcgtctg 11160
 tttcggcatt gtagccgcca actctgatgg attcgtgggt tttgacaatg atgtcacagc 11220
 ctttttcctt taggaagtcc aagtcgaaag tagtggcaat accaatgatc ttacaaccgg 11280
 cggcttttcc ggcggcaata cctgctggag cgtcttcaaa tactactacc ttagatttgg 11340
 aagggtcttg ctcatcgatc ggatattcta agccattcct gcccttcaga tatgggtctg 11400
 gatgaggctt accctgtttg acatcattag cggtaatgaa gtactttggg ctctctgattc 11460
 ccagatgctc gaaccatttt tgtgccatat cacgggtacc ggaagttgcc acagcccatt 11520
 tctcttttgg tagagcgttc aaagcgttgc acagcttaac tgcacctggg acttcaatgg 11580
 atttttcacc gtacttgacc ggaatttcag cttctaattt gttaacatac tcttcattgg 11640
 caaagtctgg agcgaactta gcaatggcat caaacgttct ccaaccatgc gagacttgga 11700
 taacgtgttc agcatcgaaa taaggtttgt ccttaccgaa atccctccag aatgcagcaa 11760
 tggctgggtg agagatgata atggtaccgt cgacgtcgaa caaagcggcg ttaactttca 11820
 aagatagagg tttagtagtc aatcccataa ttctagtctg tttcctggat ccaataaatc 11880
 taatcttcat gtagatctaa ttcttcaatc atgtccggca ggttcttcat tgggtagttg 11940
 ttgtaaacga tttggtatac ggcttcaaat aatgggaagt cttcgacaga gccacatgtt 12000
 tccaaccatt cgtgaacttc tttgcaggta attaaacctt gagcggattg gccattcaac 12060
 aactcctttt cacattccca ggcgtcctta ccagaagtag ccattagcct agcaaccttg 12120
 acgtttctac caccagcgca ggtggtgatc aaatcagcaa caccagcaga ctcttggtag 12180
 tatgtttctt ctctagattc tgggaaaaac atttgaccga atctgatgat ctcacccaaa 12240
 ccgactcttt ggatggcagc agaagcgttg ttaccccagc ctagaccttc gacgaaacca 12300
 caacctaagg caacaacggt cttcaaagca ccacagatgg agataccagc aacatcttcg 12360
 atgacactaa cgtggaagta aggtctgtgg aacaaggcct ttagaacctt atggctcgacg 12420
 tccttgccct cgcctctgaa atcctttgga atgtggtaag caactgttgt ttcagaccag 12480
 tgttcttgag cgacttcggt ggcaatgta gcaccagata gagcaccaca ttgaatacct 12540
 agttcctcag tgatgtaaga ggatagcaat tggacacctt tagcaccaac ttcaaaaccc 12600
 tttagacagg agatagctct gacgtgtgaa tcaacatgac ctttcaattg gctacagata 12660
 cggggcaaaa attgatgtgg aatgttgaaa acgatgatgt cgacatcctt gactgaatca 12720
 atcaagtctg gattagcaac caaattgtcg ggtagagtga tgccaggcaa gtatttcacg 12780
 ttttgatgtc tagtatttat gatttcagtc aatttttcac cattgatctc ttcttcgaac 12840

```

accacattt gtactatttg agcgaaaact tctgggtatc cttacaatt ttcggcaacc 12900
accttgga tagtagtacc ccagttacca gatccaatca cagtaacctt gaaaggcttt 12960
tcggcagcct tcaaagaaac agaagaggaa cttctctttc taccagcatt caagtggccg 13020
gaagttaagt ttaatctatc agcagcagca gccatggaat tgtcctcctt actagtcatg 13080
gtctgtttcc tgtgtgaaat tggtatccgc tcacaattcc acacattata cgagccggat 13140
gattaattgt caacagctca tttcagaata tttgccagaa ccgttatgat gtcggcgcaa 13200
aaaacattat ccagaacggg agtgcgcctt gagcgacacg aattatgcag tgatttacga 13260
cctgcacagc cataccacag cttccgatgg ctgcctgacg ccagaagcat tggcgcacgc 13320
tagccagtac atttaaatgg taccctctag tcaaggcctt aagtgagtcg tattacggac 13380
tggccgtcgt tttaacaagt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc 13440
ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc 13500
cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgctt gatgcggtat tttctcctta 13560
cgcatctgtg cggattttca caccgcatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 13620
ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc caacacccgc tgacgagct 13669

```

<210> 66

<211> 13543

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pSYCO103

<400> 66

```

tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga 60
taacaagaaa aagccagcct ttcatgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc 120
acgcttaaaa ataataaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc 180
ttagtgcac taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc ggcgtcggct tgaacgaatt 240
gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgctt tcacgtagtg gacaaattct 300
tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta 360
gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgct ccattgcca gtcggcagcg 420
acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aaatgcggga caacgtaagc 480
actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt taaggtttca 540
tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc cgccgctgga 600
cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct tttgtcagca agatagccag atcaatgtcg 660
atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc 720

```

agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatgggtgact 780
 tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttcaa aagggtcggtg 840
 atcaaagctc gccgcgttgt ttcatcaagc cttacgggtca ccgtaaccag caaatcaata 900
 tcaactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaagtac ggccagcaac 960
 gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg 1020
 gcgatcaccg cttccctcat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta 1080
 acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgaccacggy cgtaacgcgc ttgctgcttg 1140
 gatgcccag gcatagactg taccctcaaa aaacagtcac aacaagccat gaaaaccgcc 1200
 actgcgccgt taccaccgct gcgttcggtc aaggttctgg accagttgcg tgagcgcata 1260
 cgctacttgc attacagctt acgaaccgaa caggcttatg tccactgggt tcgtgccttc 1320
 atccgtttcc acggtgtgcy taccctggca accttgggca gcagcgaagt cgaggcattt 1380
 ctgtcctggc tggcgaacga gcgcaagggt tcggtctcca cgcacgtca ggcattggcg 1440
 gccttgctgt tcttctacgg caagggtgctg tgcacggatc tgccctggct tcaggagatc 1500
 ggaagacctc ggccgtcgcy gcgcttgccg gtggtgctga ccccgatga agtggttcgc 1560
 atcctcggtt ttctggaagg cgagcatcgt ttgttcgccc agcttctgta tggaacgggc 1620
 atgcggatca gtgaggggtt gcaactgcgg gtcaaggatc tggatttcga tcacggcacg 1680
 atcatcgctc gggagggcaa gggctccaag gatcgggctt tgatgttacc cgagagcttg 1740
 gcaaccagcc tgcgcgagca ggggaattaa ttcccacggg ttttgctgcc cgcaaacggg 1800
 ctgttctggt gttgctagtt tgttatcaga atcgcagatc cggcttcagc cggtttgccg 1860
 gctgaaagcg ctatttcttc cagaattgcc atgatttttt cccacggga ggcgtcactg 1920
 gctcccgtgt tgtcggcagc tttgattcga taagcagcat cgcctgtttc aggctgtcta 1980
 tgtgtgactg ttgagctgta acaagtgtgc tcagggtgttc aatttcatgt tctagttgct 2040
 ttgttttact ggtttcacct gttctattag gtgttacatg ctgttcatct gttacattgt 2100
 cgatctgttc atggtgaaca gctttgaatg caccaaaaac tcgtaaaagc tctgatgtat 2160
 ctatcttttt tacaccgttt tcatctgtgc atatggacag ttttcccttt gatatgtaac 2220
 ggtgaacagt tgttctactt ttgtttgtta gtcttgatgc ttcactgata gatacaagag 2280
 ccataagaac ctcagatcct tccgtattta gccagtatgt tctctagtgt ggttcgttgt 2340
 ttttgctgta gccatgagaa cgaaccattg agatcatact tactttgcat gtcactcaaa 2400
 aattttgcct caaaactggg gagctgaatt tttgcagtta aagcatcgtg tagtgttttt 2460
 cttagtccgt tatgtaggta ggaatctgat gtaatgggtt ttggtatttt gtcaccattc 2520
 atttttatct ggttggttctc aagttcggtt acgagatcca tttgtctatc tagttcaact 2580
 tggaaaatca acgtatcagt cgggcggcct cgcttatcaa ccaccaattt catattgctg 2640
 taagtgttta aatctttact tattggtttc aaaaccattt ggtaagcct tttaaactca 2700
 tggtagttat tttcaagcat taacatgaac ttaaattcat caaggctaatt ctctatattt 2760
 gccttgtagg ttttcttttg tgtagttct ttttaataacc actcataaat cctcatagag 2820

tatttgTTTT	caaaagactt	aacatgttcc	agattatatatt	ttatgaattt	ttttaactgg	2880
aaaagataag	gcaatatctc	ttcactaaaa	actaattcta	atTTTTcgct	tgagaacttg	2940
gcatagTTTg	tccactggaa	aatctcaaaag	cctttaacca	aaggattcct	gatttccaca	3000
gttctcgtca	tcagctctct	ggttgcttta	gctaatacac	cataagcatt	ttccctactg	3060
atgttcatca	tctgagcgta	ttggttataa	gtgaacgata	ccgtccgttc	tttccttgta	3120
gggttttcaa	tcgtgggggt	gagtagtgcc	acacagcata	aaattagctt	ggtttcatgc	3180
tccgttaagt	catagcgact	aatcgctagt	tcatttgctt	tgaaaacaac	taattcagac	3240
atacatctca	attggtctag	gtgattttta	tcactatacc	aattgagatg	ggctagtcaa	3300
tgataattac	tagtcctttt	cctttgagtt	gtgggtatct	gtaaattctg	ctagaccttt	3360
gctggaaaac	ttgtaaattc	tgctagaccc	tctgtaaatt	ccgctagacc	tttggtgtgt	3420
TTTTTTgttt	atattcaagt	ggttataatt	tatagaataa	agaaagaata	aaaaaagata	3480
aaaagaatag	atcccagccc	tgtgtataac	tcactacttt	agtcagttcc	gcagtattac	3540
aaaaggatgt	cgcaaacgct	gtttgctcct	ctacaaaaca	gaccttaaaa	ccctaaaggc	3600
ttaagtagca	ccctcgcaag	ctcgggcaaa	tcgctgaata	ttccttttgt	ctccgaccat	3660
caggcacctg	agtcgctgtc	TTTTtcgtga	cattcagttc	gctgcgctca	cggctctggc	3720
agtgaatggg	ggtaaattgg	actacaggcg	ccttttatgg	attcatgcaa	ggaaactacc	3780
cataatacaa	gaaaagcccg	tcacgggctt	ctcagggcgt	tttatggcgg	gtctgctatg	3840
tggtgctatc	tgactttttg	ctgttcagca	gttcctgccc	tctgattttc	cagtctgacc	3900
acttcggatt	atcccgtgac	aggtcattca	gactggctaa	tgacccaggt	aaggcagcgg	3960
tatcatcaac	aggcttacc	gtcttactgt	cgggaattca	tttaaatagt	caaaagcctc	4020
cgaccggagg	cttttgactg	ctaggcgatc	tgtgctgttt	gccacggtat	gcagcaccag	4080
cgcgagatta	tgggctcgca	cgctcgactg	tcggacgggg	gactggaac	gagaagtcat	4140
gcgagccgtc	acgcccttga	ctatgccaca	tcctgagcaa	ataattcaac	cactaaacaa	4200
atcaaccgcg	tttcccgagg	gtaaccaagc	ttgcgggaga	gaatgatgaa	caagagccaa	4260
caagttcaga	caatcacctt	ggccgcccgc	cagcaaattg	cggcggcggg	ggaaaaaaa	4320
gccactgaga	tcaacgtggc	ggtggtgttt	tccgtagtgt	accgcggagg	caacacgctg	4380
cttatccagc	ggatggacga	ggccttcgtc	tccagctgcg	atatttccct	gaataaagcc	4440
tggagcgcct	gcagcctgaa	gcaagggtacc	catgaaatta	cgtcagcggg	ccagccagga	4500
caatctctgt	acggtctgca	gctaaccaac	caacagcgaa	ttattatttt	tggcggcggc	4560
ctgccagtta	TTTTaatga	gcaggtaatt	ggcgccgtcg	gcgttagcgg	cggtagcgtc	4620
gagcaggatc	aattattagc	ccagtgcgcc	ctggattgtt	ttccgcatt	ataacctgaa	4680
gcgagaaggt	atattatgag	ctatcgtatg	ttccgccagg	cattctgagt	gttaacgagg	4740
ggaccgtcat	gtcgttttca	ccgccaggcg	tacgcctgtt	ttacgatccg	cgcgggcacc	4800
atgccggcgc	catcaatgag	ctgtgctggg	ggctggagga	gcaggggggc	ccctgccaga	4860

ccataaccta	tgacggaggc	ggtgacgccg	ctgcgctggg	cgccctggcg	gccagaagct	4920
cgccccctgcg	ggtgggtatc	gggctcagcg	cgtccggcga	gatagccctc	actcatgccc	4980
agctgccggc	ggacgcgccg	ctggctaccg	gacacgtcac	cgatagcgac	gatcaactgc	5040
gtacgctcgg	cgccaacgcc	gggcagctgg	ttaaagtcct	gccgttaagt	gagagaaact	5100
gaatgtatcg	tatctatacc	cgcaccgggg	ataaaggcac	caccgccctg	tacggcggca	5160
gccgcatcga	gaaagaccat	attcgcgtcg	aggcctacgg	caccgtcgat	gaactgatat	5220
cccagctggg	cgtctgctac	gccacgaccc	gcgacgccgg	gctgcgggaa	agcctgcacc	5280
atattcagca	gacgctgttc	gtgctggggg	ctgaactggc	cagcgatgcg	cggggcctga	5340
cccgcctgag	ccagacgata	ggcgaagagg	agatcaccgc	cctggagcgg	cttatcgacc	5400
gcaatatggc	cgagagcggc	ccgttaaaac	agttcgtgat	cccggggagg	aatctcgcct	5460
ctgcccagct	gcacgtggcg	cgcacccagt	cccgtcggct	cgaacgcctg	ctgacggcca	5520
tggaccgcgc	gcatccgctg	cgcgacgcgc	tcaaacgcta	cagcaatcgc	ctgtcggatg	5580
ccctgtttctc	catggcgcgga	atcgaagaga	ctaggcctga	tgcttgcgct	tgaactggcc	5640
tagcaaacac	agaaaaaagc	ccgcacctga	cagtgcgggc	tttttttttc	ctaggcgatc	5700
tgtgctgttt	gccacggtat	gcagcaccag	cgcgagatta	tgggctcgca	cgctcgactg	5760
tcggacgggg	gcaactggaac	gagaagtcag	gcgagccgtc	acgcccttga	ctatgccaca	5820
tcctgagcaa	ataattcaac	cactaaacaa	atcaaccgcg	tttcccggag	gtaaccaagc	5880
ttcacctttt	gagccgatga	acaatgaaaa	gatcaaaacg	atttgcagta	ctggcccagc	5940
gccccgtcaa	tcaggacggg	ctgattggcg	agtggcctga	agaggggctg	atcgccatgg	6000
acagcccctt	tgaccgggtc	tcttcagtaa	aagtggacaa	cggtctgata	gtcgaactgg	6060
acggcaaacg	ccgggaccag	tttgacatga	tcgaccgatt	tatcgccgat	tacgcgatca	6120
acgttgagcg	cacagagcag	gcaatgcgcc	tggaggcggg	ggaaatagcc	cgtatgctgg	6180
tggatattca	cgtcagccgg	gaggagatca	ttgccatcac	taccgccatc	acgccggcca	6240
aagcggctga	ggtgatggcg	cagatgaacg	tgggtggagat	gatgatggcg	ctgcagaaga	6300
tgcgtgcccg	ccggaccccc	tccaaccagt	gccacgtcac	caatctcaaa	gataatccgg	6360
tgcagattgc	cgtgacgcc	gccgaggccg	ggatccgcgg	cttctcagaa	caggagacca	6420
cggtcggtat	cgcgcgctac	gcgccgttta	acgccctggc	gctgttggtc	ggttcgcagt	6480
gcggccgccc	cggcgtgttg	acgcagtgtc	cggtggaaga	ggccaccgag	ctggagctgg	6540
gcatgcgtgg	cttaaccagc	tacgccgaga	cggtgtcggg	ctacggcacc	gaagcggtat	6600
ttaccgacgg	cgatgatacg	ccgtgggtcaa	aggcgttcct	cgcctcggcc	tacgcctccc	6660
gcgggttgaa	aatgcgctac	acctccggca	ccggatccga	agcgctgatg	ggctattcgg	6720
agagcaagtc	gatgctctac	ctcgaatcgc	gctgcatctt	cattactaaa	ggcgcggggg	6780
ttcagggact	gcaaaacggc	gcggtgagct	gtatcggcat	gaccggcgct	gtgccgtcgg	6840
gcattcgggg	ggtgctggcg	gaaaacctga	tcgcctctat	gctcgacctc	gaagtggcgt	6900
ccgccaacga	ccagactttc	tcccactcgg	atattcgccg	caccgcgcgc	accctgatgc	6960

agatgctgcc	gggcaccgac	tttattttct	ccggctacag	cgcggtgccg	aactacgaca	7020
acatgttcgc	cggctcgaac	ttcgatgcgg	aagattttga	tgattacaac	atcctgcagc	7080
gtgacctgat	ggttgacggc	ggcctgcgtc	cggtgaccga	ggcggaaacc	attgccattc	7140
gccagaaagc	ggcgcgggcg	atccaggcgg	ttttccgcga	gctggggctg	ccgccaatcg	7200
ccgacgagga	ggtggaggcc	gccacctacg	cgcacggcag	caacgagatg	ccgccgcgta	7260
acgtggtgga	ggatctgagt	gcggtggaag	agatgatgaa	gcgcaacatc	accggcctcg	7320
atattgtcgg	cgcgctgagc	cgcagcggct	ttgaggatat	cgccagcaat	attctcaata	7380
tgctgcgcca	gcgggtcacc	ggcgattacc	tgcacacctc	ggccattctc	gatcggcagt	7440
tcgaggtygt	gagtgcggtc	aacgacatca	atgactatca	ggggccgggc	accggctatc	7500
gcatctctgc	cgaacgctgg	gcggagatca	aaaatattcc	gggcgtggtt	cagcccagaca	7560
ccattgaata	aggcgggtatt	cctgtgcaac	agacaaccca	aattcagccc	tcttttacct	7620
tgaaaacccg	cgagggcggg	gtagcttctg	ccgatgaacg	cgccgatgaa	gtggtgatcg	7680
gcgtcggccc	tgcttcgat	aaacaccagc	atcacactct	gatcgatatg	ccccatggcg	7740
cgatcctcaa	agagctgatt	gccgggggtg	aagaagaggg	gcttcacgcc	cgggtggtgc	7800
gcattctgcg	cacgtccgac	gtctccttta	tggcctggga	tgcggccaac	ctgagcggct	7860
cggggatcgg	catcgggtatc	cagtcgaagg	ggaccacggg	catccatcag	cgcgatctgc	7920
tgccgctcag	caacctggag	ctgttctccc	aggcgcggct	gctgacgctg	gagacctacc	7980
ggcagattgg	caaaaacgct	gcgcgctatg	cgcgcaaaga	gtcaccttcg	ccggtgccgg	8040
tggtgaacga	tcagatggtg	cggccgaaat	ttatggccaa	agccgcgcta	tttcatatca	8100
aagagaccaa	acatgtggtg	caggacgccg	agcccgtcac	cctgcacatc	gacttagtaa	8160
gggagtgacc	atgagcgaga	aaaccatgcg	cgtgcaggat	tatccgttag	ccaccgcgtg	8220
cccgagcat	atcctgacgc	ctaccggcaa	accattgacc	gatattacct	tcgagaaggt	8280
gctctctggc	gaggtgggcc	cgcaggatgt	gcggatctcc	cgccagacct	ttgagtacca	8340
ggcgcagatt	gccgagcaga	tgacgcgcca	tgcggtggcg	cgcaatttcc	gccgcgcggc	8400
ggagcttatc	gccattcctg	acgagcgcac	tctggctatc	tataacgcgc	tgcgcccgtt	8460
ccgctcctcg	caggcgagac	tgctggcgat	cgccgacgag	ctggagcaca	cctggcatgc	8520
gacagtgaat	gccgcctttg	tccgggagtc	ggcggaagtg	tatcagcagc	ggcataagct	8580
gcgtaaagga	agctaagcgg	aggtcagcat	gccgtaata	gccgggattg	atatcggcaa	8640
cgccaccacc	gaggtggcgc	tggcgtccga	ctaccgcgag	gcgagggcgt	ttgttgccag	8700
cgggatcgtc	gcgacgacgg	gcatgaaagg	gacgcgggac	aatatcgccg	ggaccctcgc	8760
cgcgctggag	caggccctgg	cgaaaacacc	gtggtcgatg	agcgatgtct	ctcgcattcta	8820
tcttaacgaa	gccgcgccgg	tgattggcga	tgtggcgatg	gagaccatca	ccgagaccat	8880
tatcaccgaa	tcgaccatga	tcggtcataa	cccgcagacg	ccgggcgggg	tgggcgttgg	8940
cgtggggacg	actatcgccc	tcgggcggct	ggcgacgctg	ccggcggcgc	agtatgccga	9000

ggggtggatc gtactgattg acgacgccgt cgatttcctt gacgccgtgt ggtggctcaa 9060
 tgaggcgctc gaccggggga tcaacgtggt ggcgggcgatc ctcaaaaagg acgacggcgt 9120
 gctggtgaac aaccgcctgc gtaaaaccct gccggtggtg gatgaagtga cgctgctgga 9180
 gcagggtccc gagggggtaa tggcgggcgt ggaagtggcc gcgccgggcc aggtggtgcg 9240
 gatcctgtcg aatccctacg ggatcgccac cttcttcggg ctaagcccgg aagagacca 9300
 ggccatcgtc cccatcgccc gcgccctgat tggcaaccgt tccgcggtgg tgctcaagac 9360
 cccgcagggg gatgtgcagt cgcggtgat cccggcgggc aacctctaca ttagcggcga 9420
 aaagcgccgc ggagaggccg atgtcgccga gggcgcgaa gccatcatgc aggcgatgag 9480
 cgcctgcgct ccggtacgcg acatccgcg cgaaccgggc acccacgccg gcggcatgct 9540
 tgagcgggtg cgcaaggtaa tggcgctcct gaccggccat gagatgagcg cgatatacat 9600
 ccaggatctg ctggcggtgg atacgtttat tccgcgcaag gtgcagggcg ggatggccgg 9660
 cgagtgcgcc atggagaatg ccgtcgggat ggcgcgatg gtgaaagcg atcgtctgca 9720
 aatgcaggtt atcgcccgcg aactgagcgc ccgactgcag accgaggtgg tgggtggcg 9780
 cgtggaggcc aacatggcca tcgccggggc gttaaccact cccggctgtg cggcgccgct 9840
 ggcgatcctc gacctcggcg ccggctcgac ggatgcggcg atcgtcaacg cggaggggca 9900
 gataacggcg gtccatctcg ccggggcggg gaatatggtc agcctgttga ttaaaaccga 9960
 gctgggcctc gaggatcttt cgctggcgga agcgataaaa aaataccgc tggccaaagt 10020
 ggaaagcctg ttcagtattc gtcacgagaa tggcgcggtg gagtcttttc gggaagccct 10080
 cagcccgcg gtgttcgcca aagtgggtga catcaaggag ggcgaactgg tgccgatcga 10140
 taacgccagc ccgctggaaa aaattcgtct cgtgcgccgg caggcgaaaag agaaagtgtt 10200
 tgtaccaac tgcctgcgcg cgctgcgcca ggtctcacc ggcggttcca ttcgcgatat 10260
 cgcttttggt gtgctggtgg gcggctcatc gctggacttt gagatccgc agcttatcac 10320
 ggaagccttg tcgcactatg\gcgtggtcgc cgggcagggc aatattcggg gaacagaagg 10380
 gccgcgcaat gcggtcgcca ccgggtgct actggccggt caggcgaatt aaacgggcgc 10440
 tcgcgccagc ctctaggtac aaataaaaaa ggcacgtcag atgacgtgcc ttttttcttg 10500
 tctagcgtgc accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg 10560
 caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt ctggataatg 10620
 ttttttgcgc cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt 10680
 aatcatccgg ctctgataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 10740
 agaccatgac tagtaaggag gacaattcca tggctgctgc tgctgataga ttaaacttaa 10800
 cttccggcca cttgaatgct ggtagaaaga gaagttcctc ttctgtttct ttgaaggctg 10860
 ccgaaaagcc tttcaagggt actgtgattg gatctggtaa ctggggtact actattgcca 10920
 aggtggttgc cgaaaattgt aagggatacc cagaagtttt cgctccaata gtacaaatgt 10980
 ggggtgtcga agaagagatc aatggtgaaa aattgactga aatcataaat actagacatc 11040
 aaaacgtgaa atacttgctt ggcatactc taccgacaa tttggttgc aatccagact 11100

tgattgattc agtcaaggat gtcgacatca tcgttttcaa cattccacat caatTTTTgc 11160
 cccgtatctg tagccaattg aaaggTcatg ttgattcaca cgtcagagct atctcctgtc 11220
 taaagggttt tgaagttggg gctaaaggTg tccaattgct atcctcttac atcactgagg 11280
 aactaggtat tcaatgtggg gctctatctg gtgctaacat tgccaccgaa gtcgctcaag 11340
 aacactggTc tgaaacaaca gttgcttacc acattccaaa ggatttcaga ggcgagggca 11400
 aggacgtcga ccataaggTt ctaaaggcct tgttccacag accttacttc cacgttagtg 11460
 tcatcgaaga tgttgctggg atctccatct gtggTgcttt gaagaacgtt gttgccttag 11520
 gttgtggttt cgtcgaaggT ctaggctggg gtaacaacgc ttctgctgcc atccaaagag 11580
 tcggTttggg tgagatcatc agattcggTc aaatgttttt cccagaatct agagaagaaa 11640
 catactacca agagtctgct ggtgttgctg atttgatcac cacctgcgct ggtggtagaa 11700
 acgtcaaggT tgctaggcta atggctactt ctggttaagga cgcctgggaa tgtgaaaagg 11760
 agttgttgaa tggccaatcc gctcaaggTt taattacctg caaagaagTt cacgaatggT 11820
 tggaaacatg tggctctgtc gaagacttcc cattatttga agccgtatac caaatcgTtt 11880
 acaacaacta cccaatgaag aacctgccgg acatgattga agaattagat ctacatgaag 11940
 attagattta ttggatccag gaaacagact agaattatgg gattgactac taaacctcta 12000
 tctttgaaag ttaacgccgc tttgttcgac gtcgacggta ccattatcat ctctcaacca 12060
 gccattgctg cattctggag ggatttcggT aaggacaaac cttatttcga tgctgaacac 12120
 gttatccaag tctcgcatgg ttggagaacg tttgatgcc a ttgctaagTt cgctccagac 12180
 tttgccaatg aagagtatgt taacaaatta gaagctgaaa ttccggTcaa gtacggTgaa 12240
 aaatccattg aagtcccagg tgcagttaag ctgtgcaacg ctttgaacgc tctacaaaaa 12300
 gagaaatggg ctgtggcaac ttccggTacc cgtgatatgg cacaaaaatg gttcgagcat 12360
 ctgggaatca ggagacaaaa gtacttcatt accgctaattg atgtcaaaca gggtaagcct 12420
 catccagaac catatctgaa gggcaggaat ggcttaggat atccgatcaa tgagcaagac 12480
 ccttccaaat ctaaggtagt agtatttgaa gacgctccag caggTattgc cgccggaaaa 12540
 gccgccggTt gtaagatcat tggTattgcc actactttcg acttggaactt cctaaaggaa 12600
 aaaggctgtg acatcattgt caaaaaccac gaatccatca gagttggcgg ctacaatgcc 12660
 gaaacagacg aagttgaatt catTTTTgac gactacttat atgctaagga cgatctgttg 12720
 aaatggtaac ccgggctgca ggcattgcaag cttggctgtt ttggcggatg agagaagatt 12780
 ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc agaagcggTc tgataaaaca gaatttgcct 12840
 ggcggcagta gcgcggTggT cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt 12900
 agcgccgatg ttagtgTggg gtctcccat gcgagagtag ggaactgcc a ggcacaaat 12960
 aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggTgaa 13020
 cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg agcggaattg aacgttgca agcaacggcc 13080
 cggagggtgg cgggcaggac gcccgcata aactgccagg catcaaatta agcagaaggc 13140

```

catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct acaaactcca gctggatcgg gcgctagagt 13200
atacatttaa atggtaccct ctagtcaagg ccttaagtga gtcgtattac ggactggccg 13260
tcgtttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgacg 13320
cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc 13380
aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgcy gtattttctc cttacgcac 13440
tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat 13500
agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacga gct 13543

```

<210> 67

<211> 13543

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pSYCO106

<400> 67

```

tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga 60
taacaagaaa aagccagcct ttcattgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc 120
acgcttaaaa ataataaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc 180
ttagtgcatc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc ggctgcggct tgaacgaatt 240
gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct 300
tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta 360
gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgct ccattgcccc gtcggcagcg 420
acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aaatgcggga caacgtaagc 480
actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt taaggtttca 540
tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagtccctc cgccgctgga 600
cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct tttgtcagca agatagccag atcaatgtcg 660
atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc 720
agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatggtgact 780
tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttcaa aaggtcgttg 840
atcaaagctc gccgcgttgt ttcattcaagc cttacgggtca ccgtaaccag caaatcaata 900
tactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac ggccagcaac 960
gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg 1020
gcgatcaccg cttccctcat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta 1080
acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgaccacgg cgtaacgcgc ttgctgcttg 1140
gatgcccag gcatagactg taccctcaaaa aaacagtcac aacaagccat gaaaaccgcc 1200

```

actgcgccgt	taccaccgct	gcgttcggtc	aaggttcttg	accagttgcy	tgagcgcata	1260
cgctacttgc	attacagctt	acgaaccgaa	caggcttatg	tccactgggt	tcgtgccttc	1320
atccgtttcc	acggtgtgcy	tcacccggca	accttgggca	gcagcgaagt	cgaggcattt	1380
ctgtcctggc	tggcgaacga	gcgcaagggt	tcggtctcca	cgcacgtca	ggcattggcg	1440
gccttgctgt	tcttctacgg	caagggtgctg	tgcacggatc	tgccctggct	tcaggagatc	1500
ggaagacctc	ggccgtcgcg	gcgcttgccg	gtggtgctga	ccccggatga	agtggttcgc	1560
atcctcgggt	ttctggaagg	cgagcatcgt	ttgttcgccc	agcttctgta	tggaaacgggc	1620
atgcggatca	gtgaggggtt	gcaactgcgg	gtcaaggatc	tggatttcga	tcacggcacg	1680
atcatcgtgc	gggagggcaa	gggctccaag	gatcgggcct	tgatgttacc	cgagagcttg	1740
gcacccagcc	tgcgcgagca	ggggaattaa	ttcccacggg	ttttgctgcc	cgcaaacggg	1800
ctgttctggg	gttgctagtt	tgttatcaga	atcgcagatc	cggcttcagc	cggtttgccg	1860
gctgaaagcg	ctatttcttc	cagaattgcc	atgatttttt	ccccacggga	ggcgtcactg	1920
gctcccgtgt	tgtcggcagc	tttgattcga	taagcagcat	cgcctgtttc	aggctgtcta	1980
tgtgtgactg	ttgagctgta	acaagttgtc	tcagggtgttc	aatttcatgt	tctagttgct	2040
ttgttttact	ggtttcacct	gttctattag	gtgttacatg	ctgttcatct	gttacattgt	2100
cgatctgttc	atggtgaaca	gctttgaatg	caccaaaaac	tcgtaaaagc	tctgatgtat	2160
ctatcttttt	tacaccgttt	tcattctgtc	atatggacag	ttttcccttt	gatatgtaac	2220
gggtgaacagt	tgttctactt	ttgtttgtta	gtcttgatgc	ttcactgata	gatacaagag	2280
ccataagaac	ctcagatcct	tccgtattta	gccagtatgt	tctctagtgt	ggttcgttgt	2340
ttttgcgtga	gcatgagaa	cgaaccattg	agatcatact	tactttgcat	gtcactcaaa	2400
aattttgcct	caaaactggg	gagctgaatt	tttgcagtta	aagcatcgtg	tagtggtttt	2460
cttagtccgt	tatgtaggta	ggaatctgat	gtaatgggtg	ttgggtatttt	gtcaccattc	2520
atttttatct	ggttgttctc	aagttcgggt	acgagatcca	tttgtctatc	tagttcaact	2580
tggaaaatca	acgtatcagt	cgggcggcct	cgcttatcaa	ccaccaattt	catattgctg	2640
taagtgttta	aatctttact	tattggtttc	aaaaccatt	ggttaagcct	tttaaactca	2700
tggtagttat	tttcaagcat	taacatgaac	ttaaattcat	caaggcta	ctctatat	2760
gccttggtgag	ttttcttttg	tgtagttct	tttaataacc	actcataaat	cctcatagag	2820
tatttggttt	caaaagactt	aacatgttcc	agattatatt	ttatgaattt	ttttaactgg	2880
aaaagataag	gcaatatctc	ttcactaaaa	actaattcta	atttttcgct	tgagaacttg	2940
gcatagtttg	tccactggaa	aatctcaaag	cctttaacca	aaggattcct	gatttccaca	3000
gttctcgtca	tcagctctct	ggttgcttta	gctaatacac	cataagcatt	ttccctactg	3060
atgttcatca	tctgagcgta	ttggttataa	gtgaacgata	ccgtccgttc	tttccttgta	3120
gggttttcaa	tcgtgggggt	gagtagtgcc	acacagcata	aaattagctt	ggtttcatgc	3180
tccgttaagt	catagcgact	aatcgctagt	tcatttgctt	tgaaaacaac	taattcagac	3240

atacatctca	attggtctag	gtgattttta	tcactatacc	aattgagatg	ggctagtcaa	3300
tgataattac	tagtcctttt	cctttgagtt	gtgggtatct	gtaaattctg	ctagaccttt	3360
gctggaaaac	ttgtaaattc	tgctagaccc	tctgtaaatt	ccgctagacc	tttgtgtgtt	3420
ttttttgttt	atattcaagt	ggttataatt	tatagaataa	agaaagaata	aaaaaagata	3480
aaaagaatag	atcccagccc	tgtgtataac	tcactacttt	agtcagttcc	gcagtattac	3540
aaaaggatgt	cgcaaacgct	gtttgctcct	ctacaaaaca	gaccttaaaa	ccctaaaggc	3600
ttaagtagca	ccctcgcaag	ctcgggcaaa	tcgctgaata	ttccttttgt	ctccgaccat	3660
caggcacctg	agtcgctgtc	tttttcgtga	cattcagttc	gctgcgctca	cggctctggc	3720
agtgaatggg	ggtaaattgg	actacaggcg	ccttttatgg	attcatgcaa	ggaaactacc	3780
cataatacaa	gaaaagcccc	tcacgggctt	ctcagggcgt	tttatggcgg	gtctgctatg	3840
tggtgctatc	tgactttttg	ctgttcagca	gttcctgccc	tctgattttc	cagtctgacc	3900
acttcggatt	atcccgtgac	aggtcattca	gactggctaa	tgcacccagt	aaggcagcgg	3960
tatcatcaac	aggcttacc	gtcttactgt	cgggaattca	tttaaatagt	caaaagcctc	4020
cgaccggagg	cttttgactg	ctaggcgatc	tgtgctgttt	gccacggtat	gcagcaccag	4080
cgcgagatta	tgggctcgca	cgctcgactg	tcggacgggg	gacttggaac	gagaagtcag	4140
gcgagccgtc	acgcccttga	caatgccaca	tcctgagcaa	ataattcaac	cactaaacaa	4200
atcaaccgcg	tttcccggag	gtaaccaagc	ttgcgggaga	gaatgatgaa	caagagccaa	4260
caagttcaga	caatcacctt	ggccgccgcc	cagcaaattg	cggcggcggg	ggaaaaaaaa	4320
gccactgaga	tcaacgtggc	ggtggtgttt	tccgtagttg	accgcggagg	caacacgctg	4380
cttatccagc	ggatggacga	ggccttcgtc	tccagctgcg	atatttccct	gaataaagcc	4440
tggagcgcct	gcagcctgaa	gcaaggtagc	catgaaatta	cgtcagcggg	ccagccagga	4500
caatctctgt	acgggtctga	gctaaccaac	caacagcgaa	ttattatttt	tggcggcggc	4560
ctgccagtta	tttttaatga	gcaggtaatt	ggcgccgtcg	gcgttagcgg	cggtagcggc	4620
gagcaggatc	aattatttag	ccagtgcgcc	ctggattgtt	tttcgcatt	ataacctgaa	4680
gcgagaaggt	atattatgag	ctatcgtatg	ttccgccagg	cattctgagt	gttaacgagg	4740
ggaccgtcat	gtcgctttca	ccgccaggcg	tacgcctgtt	ttacgatccg	cgcgggcacc	4800
atgccggcgc	catcaatgag	ctgtgctggg	ggctggagga	gcaggggggc	ccctgccaga	4860
ccataacctt	tgacggaggc	ggtgacgccg	ctgcgctggg	cgccctggcg	gccagaagct	4920
cgcccctgcg	ggtgggtatc	gggtcagcg	cgtccggcga	gatagccctc	actcatgccc	4980
agctgccggc	ggacgcgccg	ctggctaccg	gacacgtcac	cgatagcgac	gatcaactgc	5040
gtacgctcgg	cgccaacgcc	gggcagctgg	ttaaagtcct	gccgttaagt	gagagaaact	5100
gaatgtatcg	tatctatacc	cgcaccgggg	ataaaggcac	caccgccctg	tacggcggca	5160
gccgcatcga	gaaagaccat	attcgctcgc	aggcctacgg	caccgtcgat	gaactgatat	5220
cccagctggg	cgtctgctac	gccacgaccc	gcgacgccgg	gctgcgggaa	agcctgcacc	5280
atattcagca	gacgctgttc	gtgctggggg	ctgaactggc	cagcgatgcg	cggggcctga	5340

```

cccgcctgag ccagacgata gccgaagagg agatcaccgc cctggagcgg cttatcgacc 5400
gcaatatggc cgagagcggc ccgttaaaac agttcgtgat cccggggagg aatctcgcc 5460
ctgcccagct gcacgtggcg cgcacccagt cccgtcggct cgaacgcctg ctgacggcca 5520
tggaccgcgc gcatccgctg cgcgacgcgc tcaaacgcta cagcaatcgc ctgtcggatg 5580
ccctgttctc catggcgcgga atcgaagaga ctaggcctga tgcttgcgct tgaactggcc 5640
tagcaaacac agaaaaaagc ccgcacctga cagtgcgggc ttttttttct ctaggcgata 5700
tgtgctgttt gccacggtat gcagcaccag cgcgagatta tgggctcgca cgctcgactg 5760
tcggacgggg gcactggaac gagaagtcag gcgagccgtc acgcccttga caatgccaca 5820
tcctgagcaa ataattcaac cactaaacaa atcaaccgcg tttcccggag gtaaccaagc 5880
ttcacctttt gagccgatga acaatgaaaa gatcaaaacg atttgcagta ctggcccagc 5940
gccccgtcaa tcaggacggg ctgattggcg agtggcctga agaggggctg atcgccatgg 6000
acagccccct tgaccgggtc tcttcagtaa aagtggacaa cggctctgat gtcgaactgg 6060
acggcaaacg ccgggaccag tttgacatga tcgaccgatt tatcgccgat tacgcgatca 6120
acgttgagcg cacagagcag gcaatgcgcc tggaggcggg ggaaatagcc cgtatgctgg 6180
tggatattca cgctcagccg gaggagatca ttgccatcac taccgccatc acgccggcca 6240
aagcggtcga ggtgatggcg cagatgaacg tggtgagat gatgatggcg ctgcagaaga 6300
tgctgccccg ccggaccccc tccaaccagt gccacgtcac caatctcaa gataatccgg 6360
tgagattgca cgctgacgcc gccgaggccg ggatccgcgg cttctcagaa caggagacca 6420
cggctcggtat cgcgcgtac gcgccgttta acgccctggc gctgttggtc ggcttcgagt 6480
gcggccgccc cggcgtgttg acgcagtgtc cggtggaaga ggccaccgag ctggagctgg 6540
gcatgcgtgg cttaaccagc tacgccgaga cgggtgcggg ctacggcacc gaagcggtat 6600
ttaccgacgg cgatgatacg ccgtggtcaa aggcgttcct cgcctcggcc tacgcctccc 6660
gcgggttgaa aatgcgtac acctccggca ccggatccga agcgtgatg ggctattcgg 6720
agagcaagtc gatgctctac ctcgaatcgc gctgcatctt cattactaaa ggcgccgggg 6780
ttcagggaact gcaaaacggc gcggtgagct gtatcggcat gaccggcgct gtgccgtcgg 6840
gcattcgggc ggtgctggcg gaaaacctga tcgcctctat gctcgacctc gaagtggcgt 6900
ccgccaacga ccagactttc tcccactcgg atattcgccg caccgcgcgc accctgatgc 6960
agatgctgcc gggcaccgac tttatcttct ccggctacag cgcggtgccg aactacgaca 7020
acatgttcgc cggctcgaac ttcgatgcgg aagattttga tgattacaac atcctgcagc 7080
gtgacctgat ggttgacggc ggcctgcgtc cggtgaccga ggcggaaacc attgccattc 7140
gccagaaagc ggcgcggggc atccaggcgg tttccgcga gctggggctg ccgccaatcg 7200
ccgacgagga ggtggaggcc gccacctacg cgcacggcag caacgagatg ccgccgcgta 7260
acgtggtgga ggatctgagt gcggtggaag agatgatgaa gcgcaacatc accggcctcg 7320
atattgtcgg cgcgctgagc cgcagcggct ttgaggatat cgccagcaat attctcaata 7380

```

tgctgcgcca gcgggtcacc ggcgattacc tgcagacctc ggccattctc gatcggcagt	7440
tcgaggtggt gagtgcggtc aacgacatca atgactatca ggggccgggc accggctatc	7500
gcatctctgc cgaacgctgg gcggagatca aaaatattcc gggcgtgggt cagcccagaca	7560
ccattgaata aggcgggtatt cctgtgcaac agacaacca aattcagccc tcttttacct	7620
tgaaaacccg cgagggcggg gtagcttctg ccgatgaacg cgccgatgaa gtggtgatcg	7680
gcgtcggccc tgccttcgat aaacaccagc atcacactct gatcgatatg ccccatggcg	7740
cgatcctcaa agagctgatt gccgggggtg agaagaggg gcttcacgcc cgggtgggtgc	7800
gcattctgcg cagctccgac gtctccttta tggcctggga tgcggccaac ctgagcggct	7860
cggggatcgg catcggtatc cagtcgaagg ggaccacggc catccatcag cgcgatctgc	7920
tgccgctcag caacctggag ctgttctccc aggcgcgct gctgacgctg gagacctacc	7980
ggcagattgg caaaaacgct gcgcgctatg cgcgcaaaga gtcaccttcg ccggtgccgg	8040
tgggtgaacga tcagatgggtg cggccgaaat ttatggccaa agccgcgcta tttcatatca	8100
aagagaccaa acatgtgggtg caggacgccg agcccgtcac cctgcacatc gacttagtaa	8160
gggagtgacc atgagcgaga aaaccatgcg cgtgcaggat tatccgttag ccaccgctg	8220
cccggagcat atcctgacgc ctaccggcaa accattgacc gatattacct tcgagaaggt	8280
gctctctggc gaggtggggc cgcaggatgt gcggatctcc cgccagacct ttgagtacca	8340
ggcgagatt gccgagcaga tgcagcgcca tgcggtggcg cgcaatttcc gccgcgcggc	8400
ggagcttatc gccattcctg acgagcgcat tctggctatc tataacgcgc tgcgccggtt	8460
ccgctcctcg caggcgagc tgctggcgat cgccgacgag ctggagcaca cctggcatgc	8520
gacagtgaat gccgccttg tccgggagtc ggcggaagt tatcagcagc ggcataagct	8580
gcgtaaagga agctaagcg aggtcagcat gccgttaata gccgggattg atatcgcaa	8640
cgccaccacc gaggtggcg tggcgtccga ctaccgcag gcgagggcgt ttgttgccag	8700
cgggatcgtc gcgacgacgg gcatgaaagg gacgcgggac aatatcgccg ggaccctcgc	8760
cgcgctggag caggccctgg cgaaaacacc gtggtcgatg agcgatgtct ctcgcatcta	8820
tcttaacgaa gccgcgccgg tgattggcga tgtggcgatg gagaccatca ccgagaccat	8880
tatcaccgaa tcgaccatga tcggtcataa cccgcagacg ccgggcgggg tgggcgttgg	8940
cgtggggacg actatcgccc tcgggcggct ggcgacgctg ccggcgggcg agtatgccga	9000
ggggtggatc gtactgattg acgacgccgt cgatttcctt gacgccgtgt ggtggctcaa	9060
tgaggcgctc gaccggggga tcaacgtggg ggcggcgatc ctcaaaaagg acgacggcgt	9120
gctggtgaac aaccgcctgc gtaaaaccct gccggtgggt gatgaagtga cgctgctgga	9180
gcaggtcccc gagggggtaa tggcggcggt ggaagtggcc gcgccggg aggtgggtgcg	9240
gatcctgtcg aatccctacg ggatcgccac cttcttcggg ctaagcccgg aagagacca	9300
ggccatcgtc cccatcgccc gcgccctgat tggcaaccgt tccgcggtgg tgctcaagac	9360
cccgcagggg gatgtgcagt cgcggtgat cccggcgggc aacctctaca ttagcggcga	9420
aaagcgccgc ggagaggccg atgtcgccga ggcgcggaa_gccatcatgc aggcgatgag	9480

cgctgcgct	ccggtacgcg	acatccgcg	cgaaccgggc	acccacgccg	gcggcatgct	9540
tgagcgggtg	cgcaaggtaa	tggcgtccct	gaccggccat	gagatgagcg	cgatatacat	9600
ccaggatctg	ctggcgggtg	atacgtttat	tccgcgcaag	gtgcagggcg	ggatggcccg	9660
cgagtgcgcc	atggagaatg	ccgtcgggat	ggcggcgatg	gtgaaagcgg	atcgtctgca	9720
aatgcagggt	atcgcccgcg	aactgagcgc	ccgactgcag	accgaggtgg	tgggtgggcg	9780
cgtggaggcc	aacatggcca	tcgccggggc	gttaaccact	cccggctgtg	cggcgccgct	9840
ggcgatcctc	gacctcggcg	ccggctcgac	ggatgcggcg	atcgtcaacg	cggaggggca	9900
gataacggcg	gtccatctcg	ccggggcggg	gaatatggtc	agcctgttga	ttaaaaccga	9960
gctgggcctc	gaggatcttt	cgctggcgga	agcgataaaa	aaatacccg	tggccaaagt	10020
ggaaagcctg	ttcagtattc	gtcacgagaa	tggcgcgggt	gagttctttc	gggaagccct	10080
cagcccggcg	gtgttcgcca	aagtgggtga	catcaaggag	ggcgaactgg	tgccgatcga	10140
taacgccagc	ccgctggaaa	aaattcgtct	cgctgcgccg	caggcgaaag	agaaagtgtt	10200
tgtcaccaac	tgcctgcgcg	cgctgcgcca	ggtctcacc	ggcggttcca	ttcgcgatat	10260
cgcctttgtg	gtgctggtgg	gcggctcatc	gctggacttt	gagatcccg	agcttatcac	10320
ggaagccttg	tcgcactatg	gcgtggtcgc	cgggcagggc	aatattcggg	gaacagaagg	10380
gccgcgcaat	gcggtcgcca	ccgggctgct	actggccgg	caggcgaatt	aaacgggcgc	10440
tcgcgccagc	ctctaggtac	aaataaaaaa	ggcacgtcag	atgacgtgcc	ttttttcttg	10500
tctagcgtgc	accaatgctt	ctggcgtcag	gcagccatcg	gaagctgtgg	tatggctgtg	10560
caggtcgtaa	atcactgcat	aattcgtgtc	gctcaaggcg	cactcccgtt	ctggataatg	10620
ttttttgcgc	cgacatcata	acggttcttg	caaataattct	gaaatgagct	gttgacaatt	10680
aatcatccgg	ctcgtataat	gtgtggaatt	gtgagcggat	aacaatttca	cacaggaaac	10740
agaccatgac	tagtaaggag	gacaattcca	tggctgtctg	tgctgataga	ttaaacttaa	10800
cttcggcca	cttgaatgct	ggtagaaaga	gaagttcctc	ttctgtttct	ttgaaggctg	10860
ccgaaaagcc	tttcaagggt	actgtgattg	gatctggtaa	ctgggggtact	actattgcc	10920
agggtggttc	cgaaaattgt	aagggatacc	cagaagtttt	cgctccaata	gtacaaatgt	10980
gggtgttcga	agaagagatc	aatgggtgaaa	aattgactga	aatcataaat	actagacatc	11040
aaaacgtgaa	atacttgcc	ggcatcactc	taccgcagaa	tttggttgct	aatccagact	11100
tgattgattc	agtcaaggat	gtcgacatca	tcgttttcaa	cattccacat	caatttttgc	11160
cccgtatctg	tagccaattg	aaaggctcatg	ttgattcaca	cgtcagagct	atctcctgtc	11220
taaaggggtt	tgaagttggt	gctaaagggtg	tccaattgct	atcctcttac	atcactgagg	11280
aactaggtat	tcaatgtggt	gctctatctg	gtgctaacat	tgccaccgaa	gtcgctcaag	11340
aacactggtc	tgaacaaca	gttgcttacc	acattccaaa	ggatttcaga	ggcgagggca	11400
aggacgtcga	ccataagggt	ctaaaggcct	tgttccacag	accttacttc	cacgttagtg	11460
tcacgaaga	tgttgctggt	atctccatct	gtggtgcttt	gaagaacgtt	gttgcccttag	11520

gttgtggttt cgctgaaggt ctaggctggg gtaacaacgc ttctgctgcc atccaaagag 11580
 tcggtttggg tgagatcatc agattcggtc aaatgttttt cccagaatct agagaagaaa 11640
 catactacca agagtctgct ggtgttgctg atttgatcac cacctgcgct ggtggtagaa 11700
 acgtcaaggt tgctaggcta atggctactt ctggtaagga cgcctgggaa tgtgaaaagg 11760
 agttgttgaa tggccaatcc gctcaagggt taattacctg caaagaagtt cacgaatggt 11820
 tggaaacatg tggctctgtc gaagacttcc cattatttga agccgtatac caaatcgttt 11880
 acaacaacta cccaatgaag aacctgccgg acatgattga agaattagat ctacatgaag 11940
 attagattta ttggatccag gaaacagact agaattatgg gattgactac taaacctcta 12000
 tctttgaaag ttaacgccgc tttgttcgac gtcgacggta ccattatcat ctctcaacca 12060
 gccattgctg cattctggag ggatttcggt aaggacaaac cttatttcga tgctgaacac 12120
 gttatccaag tctcgcattg ttggagaacg tttgatgcca ttgctaagtt cgctccagac 12180
 tttgccaatg aagagtatgt taacaaatta gaagctgaaa ttccgggtcaa gtacgggtgaa 12240
 aaatccattg aagtcacagg tgcagttaag ctgtgcaacg ctttgaacgc tctacaaaaa 12300
 gagaaatggg ctgtggcaac ttccggtacc cgtgatattg caaaaaatg gttcgagcat 12360
 ctgggaatca ggagacaaaa gtacttcatt accgctaatt atgtcaaaca gggtaagcct 12420
 catccagaac catatctgaa gggcaggaat ggcttaggat atccgatcaa tgagcaagac 12480
 ccttccaaat ctaaggtagt agtatttgaa gacgtccag caggatttgc cgccggaaaa 12540
 gccgccggtt gtaagatcat tggatttgcc actactttcg acttggactt cctaaaggaa 12600
 aaaggctgtg acatcattgt caaaaaccac gaatccatca gagttggcgg ctacaatgcc 12660
 gaaacagacg aagttgaatt catTTTTgac gactacttat atgctaagga cgatctgttg 12720
 aaatggtaac ccgggctgca ggcatgcaag cttggctgtt ttggcggatg agagaagatt 12780
 ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttgcct 12840
 ggcggcagta gcgcgggtgt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt 12900
 agcgcgatg gtagtggtgg gtctcccat gcgagagtag ggaactgcca ggcacaaat 12960
 aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgtcgggtgaa 13020
 cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg agcggatttg aacgttgca agcaacggcc 13080
 cggaggggtg cgggcaggac gcccgccata aactgccagg catcaaatta agcagaaggc 13140
 catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct acaaactcca gctggatcgg gcgctagagt 13200
 atacatttaa atggtaccct ctagtcaagg ccttaagtga gtcgtattac ggactggccg 13260
 tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggttac ccaacttaat cgccttgacg 13320
 cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc 13380
 aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc 13440
 tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat 13500
 agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacga gct 13543

<210> 68

<211> 13402

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Plásmido pSYCO109

<400> 68

```

tagtaaagcc ctcgctagat tttaatgcgg atgttgcgat tacttcgcca actattgcga      60
taacaagaaa aagccagcct ttcattgatat atctcccaat ttgtgtaggg cttattatgc      120
acgcttaaaa ataataaaaag cagacttgac ctgatagttt ggctgtgagc aattatgtgc      180
ttagtgcatc taacgcttga gttaagccgc gccgcgaagc ggcgtcggct tgaacgaatt      240
gttagacatt atttgccgac taccttggtg atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct      300
tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta      360
gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggaggcgct ccattgcca gtcggcagcg      420
acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aaatgcggga caacgtaagc      480
actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcgcgaggt tccatagcgt taaggtttca      540
tttagcgctt caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc cgccgctgga      600
cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct ttgttcagca agatagccag atcaatgtcg      660
atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc      720
agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatggtgact      780
tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttcaa aaggctcgtt      840
atcaaagctc gccgcgttgt ttcattcaagc cttacggtca ccgtaaccag caaatcaata      900
tactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac ggccagcaac      960
gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg     1020
gcgatcaccg cttccctcat gatgtttaac ttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta     1080
acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgaccacgg cgtaacgcgc ttgctgcttg     1140
gatgcccag gcatagactg taccctaaaa aaacagtcac aacaagccat gaaaaccgcc     1200
actgcgccgt taccaccgct gcgttcggtc aaggttcttg accagttgcg tgagcgcata     1260
cgctacttgc attacagctt acgaaccgaa caggcttatg tccactgggt tcgtgccttc     1320
atccgtttcc acggtgtgct tcacccggca accttgggca gcagcgaagt cgaggcattt     1380
ctgtcctggc tggcgaacga gcgcaagggt tcggtctcca cgcatcgtca ggcattggcg     1440
gccttgctgt tcttctacgg caagggtgctg tgcacggatc tgccctggct tcaggagatc     1500
ggaagacctc ggccgtcgcg gcgcttgccg gtggtgctga ccccgatga agtggttcgc     1560
atcctcgggt ttctggaagg cgagcatcgt ttgttcgccc agcttctgta tggaacgggc     1620

```

atgcggatca	gtgaggggtt	gcaactgcgg	gtcaaggatc	tggatttcga	tcacggcacg	1680
atcatcgtgc	gggagggcaa	gggctccaag	gatcgggcct	tgatgttacc	cgagagcttg	1740
gcacccagcc	tgcgcgagca	ggggaattaa	ttcccacggg	ttttgctgcc	cgcaaacggg	1800
ctgttctggt	gttgctagtt	tgttatcaga	atcgcagatc	cggcttcagc	cggtttgccg	1860
gctgaaagcg	ctatttcttc	cagaattgcc	atgatttttt	ccccacggga	ggcgtcactg	1920
gctcccgtgt	tgtcggcagc	tttgattcga	taagcagcat	cgcctgtttc	aggctgtcta	1980
tgtgtgactg	ttgagctgta	acaagtgtgc	tcaggtgttc	aatttcatgt	tctagtgtct	2040
ttgttttact	ggtttcacct	gttctattag	gtgttacatg	ctgttcacct	gttacattgt	2100
cgatctgttc	atggtgaaca	gctttgaatg	caccaaaaac	tcgtaaaagc	tctgatgtat	2160
ctatcttttt	tacaccgttt	tcatctgtgc	atatggacag	ttttcccttt	gatatgtaac	2220
ggtgaacagt	tgttctactt	ttgtttgtta	gtcttgatgc	ttcactgata	gatacaagag	2280
ccataagaac	ctcagatcct	tccgtattta	gccagtatgt	tctctagtgt	ggttcgttgt	2340
ttttgcgtga	gccatgagaa	cgaaccattg	agatcatact	tactttgcat	gtcactcaaa	2400
aattttgcct	caaaactggg	gagctgaatt	tttgcagtta	aagcatcgtg	tagtgttttt	2460
cttagtccgt	tatgtaggta	ggaatctgat	gtaatggttg	ttggtatttt	gtcaccattc	2520
atttttatct	ggttgttctc	aagttcgggt	acgagatcca	tttgtctatc	tagttcaact	2580
tggaaaatca	acgtatcagt	cgggcggcct	cgcttatcaa	ccaccaatth	catattgctg	2640
taagtgttta	aatctttact	tattggtttc	aaaacccatt	ggttaagcct	tttaaactca	2700
tggtagttat	tttcaagcat	taacatgaac	ttaaattcat	caaggctaatt	ctctatattt	2760
gccttgtgag	ttttcttttg	tgtagtttct	tttaataacc	actcataaat	cctcatagag	2820
tatttgtttt	caaaagactt	aacatgttcc	agattatatt	ttatgaattt	ttttaactgg	2880
aaaagataag	gcaatatctc	ttcactaaaa	actaattcta	atttttcgct	tgagaacttg	2940
gcatagtttg	tccactggaa	aatctcaaag	cctttaacca	aaggattcct	gatttccaca	3000
gttctcgtca	tcagctctct	ggttgcttta	gctaatacac	cataagcatt	ttccctactg	3060
atgttcatca	tctgagcgta	ttggttataa	gtgaacgata	ccgtccgttc	tttccttgta	3120
gggttttcaa	tcgtgggggt	gagtagtgcc	acacagcata	aaattagctt	ggtttcatgc	3180
tccgttaagt	catagcgact	aatcgctagt	tcatttgctt	tgaaaacaac	taattcagac	3240
atacatctca	attgggtctag	gtgattttta	tcactatacc	aattgagatg	ggctagtcaa	3300
tgataattac	tagtcctttt	cctttgagtt	gtgggtatct	gtaaattctg	ctagaccttt	3360
gctggaaaac	ttgtaaattc	tgctagaccc	tctgtaaatt	ccgctagacc	tttgtgtgtt	3420
ttttttgttt	atattcaagt	ggttataatt	tatagaataa	agaaagaata	aaaaaagata	3480
aaaagaatag	atcccagccc	tgtgtataac	tcactacttt	agtcagttcc	gcagtattac	3540
aaaaggatgt	cgcaaacgct	gtttgctcct	ctacaaaaca	gaccttaaaa	ccctaaaggc	3600
ttaagtagca	ccctcgcaag	ctcgggcaaa	tcgctgaata	ttccttttgt	ctccgaccat	3660
caggcacctg	agtcgctgtc	tttttcgtga	cattcagttc	gctgcgctca	cggctctggc	3720

agtgaatggg	ggtaaatggc	actacaggcg	ccttttatgg	attcatgcaa	ggaaactacc	3780
cataatacaa	gaaaagcccc	tcacgggctt	ctcagggcgt	tttatggcgg	gtctgctatg	3840
tggtgctatc	tgactttttg	ctgttcagca	gttcctgccc	tctgattttc	cagtctgacc	3900
acttcggatt	atcccgtgac	aggtcattca	gactggctaa	tgcacccagt	aaggcagcgg	3960
tatcatcaac	aggcttacct	gtcttactgt	cgggaattca	tttaaatagt	caaaagcctc	4020
cgaccggagg	cttttgactg	ctaggcgatc	tgtgctgttt	gccacggtat	gcagcaccag	4080
cgcgagatta	tgggctcgca	cgctcgactg	tcggacgggg	gcactggaac	gagaagtcag	4140
gcgagccgtc	acgcccttga	caatgccaca	tcctgagcaa	ataattcaac	cactaaacaa	4200
atcaaccgcg	tttcccggag	gtaaccaagc	ttgcgggaga	gaatgatgaa	caagagccaa	4260
caagttcaga	caatcaccct	ggccgccgcc	cagcaaattg	cggcggcggg	ggaaaaaaaa	4320
gccactgaga	tcaacgtggc	ggtggtgttt	tccgtagttg	accgcggagg	caacacgctg	4380
cttatccagc	ggatggacga	ggccttcgtc	tccagctgcg	atatttccct	gaataaagcc	4440
tggagcgctt	gcagcctgaa	gcaaggtagc	catgaaatta	cgtcagcggg	ccagccagga	4500
caatctctgt	acgggtctga	gctaaccaac	caacagcgaa	ttattatttt	tggcggcggc	4560
ctgccagtta	tttttaatga	gcaggtaatt	ggcgccgctg	gcgttagcgg	cggtagcggtc	4620
gagcaggatc	aattatttagc	ccagtgcgcc	ctggattgtt	tttccgcatt	ataacctgaa	4680
gcgagaaggt	atattatgag	ctatcgtatg	ttccgccagg	cattctgagt	gttaacgagg	4740
ggaccgtcat	gtcgttttca	ccgccaggcg	tacgcctgtt	ttacgatccg	cgcgggcacc	4800
atgccggcgc	catcaatgag	ctgtgctggg	ggctggagga	gcaggggggc	ccctgccaga	4860
ccataaccta	tgacggaggc	ggtgacgccg	ctgcgctggg	cgccctggcg	gccagaagct	4920
cgcctcctgc	ggtgggtatc	gggctcagcg	cgtccggcga	gatagccctc	actcatgccc	4980
agctgccggc	ggacgcgccg	ctggctaccg	gacacgtcac	cgatagcgac	gatcaactgc	5040
gtacgctcgg	cgccaacgcc	gggcagctgg	ttaaagtcct	gccgttaagt	gagagaaact	5100
gaatgtatcg	tatctatacc	cgcaccgggg	ataaaggcac	caccgccctg	tacggcgcca	5160
gccgcatcga	gaaagaccat	attcgcgtcg	aggcctacgg	caccgtcgat	gaactgatat	5220
cccagctggg	cgtctgctac	gccacgaccc	gcgacgccgg	gctgcgggaa	agcctgcacc	5280
atattcagca	gacgctgttc	gtgctggggg	ctgaactggc	cagcgatgcg	cggggcctga	5340
cccgccctgag	ccagacgata	ggcgaagagg	agatcaccgc	cctggagcgg	cttatcgacc	5400
gcaatatggc	cgagagcggc	ccgttaaaac	agttcgtgat	ccgggggagg	aatctcgcct	5460
ctgcccagct	gcaccctgat	gcttgcgctt	gaactggcct	agcaaacaca	gaaaaaagcc	5520
cgcacctgac	agtgcgggct	ttttttttcc	taggcgatct	gtgctgtttg	ccacgggatg	5580
cagcaccagc	gcgagattat	gggctcgcac	gctcgactgt	cggacggggg	cactggaacg	5640
agaagtcagg	cgagccgtca	cgccttgac	aatgccacat	cctgagcaaa	taattcaacc	5700
actaaacaaa	tcaaccgcgt	ttcccggagg	taaccaagct	tcaccttttg	agccgatgaa	5760

caatgaaaag	atcaaaacga	tttgcagtac	tggcccagcg	ccccgtcaat	caggacgggc	5820
tgattggcga	gtggcctgaa	gaggggctga	tcgccatgga	cagccccctt	gacccggtct	5880
cttcagtaaa	agtggacaac	ggtctgatcg	tcgaactgga	cggcaaacgc	cgggaccagt	5940
ttgacatgat	cgaccgattt	atcgccgatt	acgcgatcaa	cggtgagcgc	acagagcagg	6000
caatgcgctt	ggaggcggtg	gaaatagccc	gtatgctggt	ggatattcac	gtcagccggg	6060
aggagatcat	tgccatcact	accgccatca	cgccggccaa	agcggtcgag	gtgatggcgc	6120
agatgaacgt	ggtggagatg	atgatggcgc	tgcagaagat	gcgtgcccgc	cggacccccct	6180
ccaaccagt	ccacgtcacc	aatctcaaag	ataatccggt	gcagattgcc	gctgacgccg	6240
ccgaggccgg	gatccgcggc	ttctcagaac	aggagaccac	ggtcgggtatc	gcgcgctacg	6300
cgccgtttta	cgccctggcg	ctgttggtcg	gttcgcagtg	cggccgcccc	ggcgtgttga	6360
cgcagtgtct	ggtggaagag	gccaccgagc	tggagctggg	catgcgtggc	ttaaccagct	6420
acgccgagac	ggtgtcggtc	tacggcaccg	aagcgggtatt	taccgacggc	gatgatacgc	6480
cgtggtcaaa	ggcgttcctc	gcctcggcct	acgcctcccc	cgggttgaaa	atgcgctaca	6540
cctccggcac	cggatccgaa	gcgctgatgg	gctattcggg	gagcaagtcg	atgctctacc	6600
tcgaatcgcg	ctgcatcttc	attactaaag	gcgccgggggt	tcagggactg	caaaacggcg	6660
cggtgagctg	tatcggcatg	accggcgctg	tgccgtcggg	cattcggggcg	gtgctggcgg	6720
aaaacctgat	cgctcttatg	ctcgacctcg	aagtggcgtc	cgccaacgac	cagactttct	6780
cccactcggg	tattcgccgc	accgcgcgca	ccctgatgca	gatgctgccg	ggcaccgact	6840
ttatttttct	cggctacagc	gcggtgccga	actacgacaa	catgttcgcc	ggctcgaact	6900
tcgatgcgga	agattttgat	gattacaaca	tcctgcagcg	tgacctgatg	gttgacggcg	6960
gcctgcgtcc	ggtgaccgag	gcggaaacca	ttgccattcg	ccagaaagcg	gcgcggggcga	7020
tccaggcgggt	tttccgcgag	ctggggctgc	cgccaatcgc	cgacgaggag	gtggaggccg	7080
ccacctacgc	gcacggcagc	aacgagatgc	cgccgcgtaa	cgtggtggag	gatctgagtg	7140
cggtggaaga	gatgatgaag	cgcaacatca	ccggcctcga	tattgtcggc	gcgctgagcc	7200
gcagcggctt	tgaggatatc	gccagcaata	ttctcaatat	gctgcgccag	cgggtcaccg	7260
gcgattacct	gcagacctcg	gccattctcg	atcggcagtt	cgagggtggtg	agtgcgggtca	7320
acgacatcaa	tgactatcag	gggccgggca	ccggctatcg	catctctgcc	gaacgctggg	7380
cggagatcaa	aaatattccg	ggcgtggttc	agcccgacac	cattgaataa	ggcgggtattc	7440
ctgtgcaaca	gacaacccaa	attcagccct	cttttaccct	gaaaacccgc	gagggcgggg	7500
tagcttctgc	cgatgaacgc	gccgatgaag	tgggtgatcg	cgtcggccct	gccttcgata	7560
aacaccagca	tcacactctg	atcgatatgc	cccatggcgc	gacccctcaa	gagctgattg	7620
ccgggggtgga	agaagagggg	cttcacgccc	gggtggtgcg	cattctgcgc	acgtccgacg	7680
tctcctttat	ggcctgggat	gcggccaacc	tgagcggctc	ggggatcggc	atcgggtatcc	7740
agtcgaaggg	gaccacgggtc	atccatcagc	gcgatctgct	gccgctcagc	aacctggagc	7800
tgttctccca	ggcgccgctg	ctgacgctgg	agacctaccg	gcagattggc	aaaaacgctg	7860

cgcgctatgc	gcgcaaagag	tcaccttcgc	cggtgccggt	ggtgaacgat	cagatggtgc	7920
ggccgaaatt	tatggccaaa	gccgcgctat	ttcatatcaa	agagaccaa	catgtggtgc	7980
aggacgccga	gcccgtcacc	ctgcacatcg	acttagtaag	ggagtgacca	tgagcgagaa	8040
aaccatgcmc	gtgcaggatt	atccgttagc	cacccgctgc	ccggagcata	tcctgacgcc	8100
taccggcaaa	ccattgaccg	atattaccct	cgagaagggtg	ctctctggcg	aggtgggccc	8160
gcaggatgtg	cggatctccc	gccagaccct	tgagtaccag	gcgcagattg	ccgagcagat	8220
gcagcgccat	gcggtggcgc	gcaatttccg	ccgcgcggcg	gagcttatcg	ccattcctga	8280
cgagcgcatt	ctggctatct	ataacgcgct	gcgcccgttc	cgctcctcgc	aggcggagct	8340
gctggcgatc	gccgacgagc	tggagcacac	ctggcatgcg	acagtgaatg	ccgcctttgt	8400
ccgggagtcg	gcggaagtgt	atcagcagcg	gcataagctg	cgtaaaggaa	gctaagcgga	8460
ggtcagcatg	ccgttaatag	ccgggattga	tatcggcaac	gccaccaccg	aggtggcgct	8520
ggcgtccgac	taccgcgagg	cgagggcgtt	tgttgccagc	gggatcgtcg	cgacgacggg	8580
catgaaagg	acgcgggaca	atatcgccgg	gaccctcgcc	gcgctggagc	aggccctggc	8640
gaaaacaccg	tggtcgtatg	gcgatgtctc	tcgcatctat	cttaacgaag	ccgcgccggt	8700
gattggcgat	gtggcgatgg	agaccatcac	cgagaccatt	atcaccgaat	cgaccatgat	8760
cggtcataac	ccgcagacgc	cgggcggggt	gggcgttggc	gtggggacga	ctatcgccct	8820
cgggcggtcg	gcgacgctgc	cggcggcgca	gtatgccgag	gggtggatcg	tactgattga	8880
cgacgccgtc	gatttccttg	acgccgtgtg	gtggctcaat	gaggcgctcg	accgggggat	8940
caacgtggtg	gcggcgatcc	tcaaaaagga	cgacggcggtg	ctggtgaaca	accgcctgcg	9000
taaaaccctg	ccggtggtgg	atgaagtga	gctgctggag	cagggtccccg	agggggtaat	9060
ggcggcggtg	gaagtggccg	cgccggggcca	ggtggtgctg	atcctgtcga	atccctacgg	9120
gatcgccacc	ttcttcgggc	taagcccggg	agagaccag	gccatcgctc	ccatcgccccg	9180
cgccctgatt	ggcaaccggt	ccgcggtggt	gctcaagacc	ccgcaggggg	atgtgcagtc	9240
gcgggtgatk	ccggcgggca	acctctacat	tagcggcgaa	aagcgcgcg	gagaggccga	9300
tgtcgccgag	ggcgcggaag	ccatcatgca	ggcgatgagc	gcctgcgctc	cggtacgcga	9360
catccgcggc	gaaccgggca	cccacgccgg	cggcatgctt	gagcgggtgc	gcaaggtaat	9420
ggcgtcccctg	accggccatg	agatgagcgc	gatatacatc	caggatctgc	tggcgggtgga	9480
tacgtttatt	ccgcgcaagg	tgagggcgcg	gatggccggc	gagtgcgcca	tggagaatgc	9540
cgtcgggatg	gcggcgatgg	tgaaagcgga	tcgtctgcaa	atgcaggtta	tcgcccgcga	9600
actgagcgcc	cgactgcaga	ccgaggtggt	ggtgggcggc	gtggaggcca	acatggccat	9660
cgccggggcg	ttaaccactc	ccggctgtgc	ggcgccgctg	gcgatcctcg	acctcggcgc	9720
cggtctgacg	gatgcggcga	tcgtcaacgc	ggaggggcag	ataacggcgg	tccatctcgc	9780
cggggcgggg	aatatggtca	gcctgttgat	taaaaccgag	ctgggcctcg	aggatctttc	9840
gctggcgga	gcgataaaaa	aatacccgtc	ggccaaagtg	gaaagcctgt	tcagtattcg	9900

tcacgagaat ggcgcggtgg agttcttttcg ggaagccctc agcccggcgg tgttcgccaa 9960
 agtgggtgtac atcaaggagg gcgaactggt gccgatcgat aacgccagcc cgctggaaaa 10020
 aattcgtctc gtgcgccggc aggcgaaaga gaaagtgttt gtcaccaact gcctgcgcgc 10080
 gctgcgccag gtctcaccgc gcggttccat tcgcgatatc gcccttgttg tgctgggtggg 10140
 cggctcatcg ctggactttg agatcccga gcttatcacg gaagccttgt cgcactatgg 10200
 cgtggtcgcc gggcagggca atattcgggg aacagaaggg ccgcgcaatg cggtcgccac 10260
 cgggctgcta ctggccggtc aggcgaatta aacgggcgct cgcgccagcc tctaggtaca 10320
 aataaaaaag gcacgtcaga tgacgtgcct tttttcttgt ctagcgtgca ccaatgcttc 10380
 tggcgtcagg cagccatcgg aagctgtggt atggctgtgc aggtcgtaaa tctactgcata 10440
 attcgtgtcg ctcaaggcgc actcccgttc tggataatgt tttttgcgcc gacatcataa 10500
 cggttctggc aaatattctg aaatgagctg ttgacaatta atcatccggc tcgtataatg 10560
 tgttgaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gaccatgact agtaaggagg 10620
 acaattccat ggctgctgct gctgatagat taaacttaac ttccggccac ttgaatgctg 10680
 gtagaaagag aagttcctct tctgtttctt tgaaggctgc cgaaaagcct ttcaaggtta 10740
 ctgtgattgg atctggtaac tggggtacta ctattgccaa ggtggttgcc gaaaattgta 10800
 aggatataccc agaagttttc gtcctaatag tacaatgtg ggtgttcgaa gaagagatca 10860
 atggtgaaaa attgactgaa atcataaata ctagacatca aaacgtgaaa tacttgctg 10920
 gcatcactct acccgacaat ttggttgcta atccagactt gattgattca gtcaaggatg 10980
 tcgacatcat cgttttcaac attccacatc aatttttgcc ccgtatctgt agccaattga 11040
 aaggatcatgt tgattcacac gtcagagcta tctcctgtct aaagggtttt gaagttgggtg 11100
 ctaaagggtgt ccaattgcta tcctcttaca tctactgagga actaggtatt caatgtgggtg 11160
 ctctatctgg tgctaacatt gccaccgaag tcgctcaaga aactgggtct gaaacaacag 11220
 ttgcttacca cattccaaag gatttcagag gcgagggcaa ggacgtcgac cataaggttc 11280
 taaaggcctt gttccacaga cttacttcc acgttagtgt catcgaagat gttgctggta 11340
 tctccatctg tgggtgcttg aagaacgttg ttgccttagg ttgtggtttc gtcgaagggtc 11400
 taggctgggg taacaacgct tctgctgcca tccaaagagt cggtttgggt gagatcatca 11460
 gattcgggtca aatgtttttc ccagaatcta gagaagaaac atactaccaa gagtctgctg 11520
 gtgttgctga tttgatcacc acctgcgctg gtggtagaaa cgtcaagggt gctaggctaa 11580
 tggctacttc tggttaaggac gcctgggaat gtgaaaagga gttgttgaat ggccaatccg 11640
 ctcaagggtt aattacctgc aaagaagttc acgaatggtt ggaaacatgt ggctctgtcg 11700
 aagacttccc attatttgaa gccgtatacc aaatcgttta caacaactac ccaatgaaga 11760
 acctgccgga catgattgaa gaattagatc tacatgaaga ttagatttat tggatccagg 11820
 aaacagacta gaattatggg attgactact aaacctctat ctttgaaagt taacgccgct 11880
 ttgttcgacg tcgacggtac cattatcatc tctcaaccag ccattgctgc attctggagg 11940
 gatttcggta aggacaaacc ttatttcgat gctgaacacg ttatccaagt ctcgcatggt 12000

```

tggagaacgt ttgatgccat tgctaagttc gtcacagact ttgccaatga agagtatggt 12060
aacaattag aagctgaaat tccggtcaag tacggtgaaa aatccattga agtcccaggt 12120
gcagttaagc tgtgcaacgc tttgaacgct ctacaaaaag agaaatgggc tgtggcaact 12180
tccggtaccc gtgatatggc acaaaaatgg ttcgagcatc tgggaatcag gagaccaaag 12240
tacttcatta ccgctaataga tgtcaaacag ggtaagcctc atccagaacc atatctgaag 12300
ggcaggaatg gcttaggata tccgatcaat gagcaagacc cttccaaatc taaggtagta 12360
gtatttgaag acgctccagc aggtattgcc gccggaaaag ccgccggttg taagatcatt 12420
ggatttgcca ctactttcga cttggacttc cttaaaggaaa aaggctgtga catcattgtc 12480
aaaaaccacg aatccatcag agttggcggc tacaatgccg aaacagacga agttgaattc 12540
atTTTTgacg actacttata tgctaaggac gatctgttga aatggtaacc cgggctgcag 12600
gcatgcaagc ttggctgttt tggcggatga gagaagattt tcagcctgat acagattaaa 12660
tcagaacgca gaagcgggtc gataaaacag aatttgcctg gcggcagtag cgcggtggtc 12720
ccacctgacc ccatgccgaa ctacagaagt aaacgccgta gcgccgatgg tagtgtgggg 12780
tctcccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata aaacgaaagg ctacgtcgaa 12840
agactgggccc tttcgtttta tctgttgttt gtcggtgaac gctctcctga gtaggacaaa 12900
tccgccggga gcggatttga acgttgcgaa gcaacggccc ggaggggtggc gggcaggacg 12960
cccgccataa actgccaggc atcaaattaa gcagaaggcc atcctgacgg atggcctttt 13020
tgcgtttcta caaactccag ctggatcggg cgctagagta tacatttaaa tggtagcctc 13080
tagtcaaggc cttaagttag tcgtattacg gactggccgt cgttttacaa cgctcgtgact 13140
gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgacgc acatccccct ttcgccagct 13200
ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 13260
gcgaatggcg cctgatgcgg tatTTTctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca 13320
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag ccccgacacc 13380
cgccaacacc cgctgacgag ct 13402

```


REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *E. coli* que comprende:

a) un sistema endógeno alterado de fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-glucosa que evita la expresión de las proteínas activas del sistema de la fosfotransferasa PEP-glucosa que comprende uno o varios entre:

- 5 i) un gen endógeno alterado *ptsH* que evita la expresión de una proteína fosfotransportadora activa;
- ii) un gen endógeno alterado *ptsI* que evita la expresión de una fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-proteína activa; y
- iii) un gen endógeno alterado *crr* que evita la expresión de un componente activo IIA específico de glucosa;

10 b) un gen endógeno *galP* regulado por aumento que codifica un simportador activo galactosa-protón, dando como resultado dicha regulación por aumento una actividad incrementada del simportador galactosa-protón;

c) un gen endógeno *glk* regulado por aumento que codifica una glucocinasa activa, dando como resultado dicha regulación por aumento una actividad glucocinasa incrementada;

15 d) un gen endógeno *gapA* regulado por disminución que codifica una deshidrogenasa de glicerolaldehído-3-fosfato activa, dando como resultado dicha regulación por disminución una actividad deshidrogenasa de glicerolaldehído-3-fosfato reducida;

e) una deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato;

f) una glicerol-3-fosfatasa;

g) una deshidratasa; y

20 h) un factor de reactivación de la deshidratasa;

en donde dicha cepa de *E. coli* es capaz de bioconvertir una fuente adecuada de carbono en glicerol, 1,3-propanodiol o glicerol y 1,3-propanodiol.

2. La cepa de *E. coli* de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente uno o varios entre:

25 i) un gen endógeno alterado *arcA* que evita la expresión de una proteína activa para el control de la respiración aerobia;

j) un gen endógeno *ppc* regulado por aumento que codifica una carboxilasa de fosfoenolpiruvato activa;

k) un gen endógeno *btuR* regulado por aumento que codifica una adenosiltransferasa de cob(I)alamina activa; y

30 l) un gen *yqhD* regulado por aumento que codifica una deshidrogenasa de alcohol activa.

3. La cepa de *E. coli* de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende adicionalmente uno o varios entre:

m) un gen endógeno alterado *mgsA* que evita la expresión de una sintasa de metilglixal activa;

n) un gen endógeno alterado *ackA* que evita la expresión de una cinasa de acetato activa;

35 o) un gen endógeno alterado *pta* que evita la expresión de una fosfotransacetilasa activa;

p) un gen endógeno alterado *aldA* que evita la expresión de una deshidrogenasa A de aldehído activa; y

q) un gen endógeno alterado *aldB* que evita la expresión de una deshidrogenasa B de aldehído activa.

4. La cepa de *E. coli* de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, que comprende adicionalmente uno o varios entre:

40 r) un gen endógeno alterado *edd* que evita la expresión de una deshidratasa de fosfogluconato activa;

s) un gen endógeno alterado *glpK* que evita la expresión de una cinasa de glicerol activa; y

t) un gen endógeno alterado *gldA* que evita la expresión de una deshidrogenasa de glicerol activa dependiente de NADH.

5. Un método para la bioproducción de 1,3-propanodiol que comprende poner en contacto la cepa de

E. coli de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4, con un sustrato de carbono adecuado bajo condiciones adecuadas.

6. Una cepa de *E. coli* que comprende

- 5 a) un sistema endógeno alterado de fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-glucosa que comprende uno o varios entre:
 - i) un gen endógeno alterado *ptsH* que evita la expresión de una proteína fosfotransportadora activa;
 - ii) un gen endógeno alterado *ptsI* que evita la expresión de una fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-proteína activa; y
 - 10 iii) un gen endógeno alterado *crr* que evita la expresión de un componente activo IIA específico de glucosa;
- b) un gen endógeno *galP* regulado por aumento que codifica un simportador activo galactosa-protón, dando como resultado dicha regulación por aumento una actividad incrementada del simportador galactosa-protón;
- c) un gen endógeno *glk* regulado por aumento que codifica una glucocinasa activa, dando como resultado dicha regulación por aumento una actividad glucocinasa incrementada;
- 15 d) un gen endógeno *gapA* regulado por disminución que codifica una deshidrogenasa de glicerolaldehído-3-fosfato activa, dando como resultado dicha regulación por disminución una actividad deshidrogenasa de glicerolaldehído-3-fosfato reducida;
- e) un gen endógeno alterado *arcA* que evita la expresión de una proteína activa para el control de la respiración aerobia;
- 20 f) un gen endógeno *ppc* regulado por aumento que codifica una carboxilasa de fosfoenolpiruvato activa, dando como resultado dicha regulación por aumento una actividad carboxilasa de fosfoenolpiruvato incrementada;
- g) un gen endógeno *btuR* regulado por aumento que codifica una adenosiltransferasa de cob(I)alamina activa, dando como resultado dicha regulación por aumento una actividad adenosiltransferasa de cob(I)alamina incrementada;
- 25 h) un gen *yqhD* regulado por aumento que codifica una deshidrogenasa de alcohol activa, dando como resultado dicha regulación por aumento una actividad deshidrogenasa de alcohol incrementada;
- i) un gen endógeno alterado *mgsA* que evita la expresión de una sintasa de metilglioxal activa;
- j) un gen endógeno alterado *ackA* que evita la expresión de una cinasa de acetato activa;
- 30 k) un gen endógeno alterado *pta* que evita la expresión de una fosfotransacetilasa activa;
- l) un gen endógeno alterado *aldA* que evita la expresión de una deshidrogenasa A de aldehído activa;
- m) un gen endógeno alterado *aldB* que evita la expresión de una deshidrogenasa B de aldehído activa;
- n) un gen endógeno alterado *edd* que evita la expresión de una deshidratasa de fosfogluconato activa;
- o) un gen endógeno alterado *glpK* que evita la expresión de una cinasa de glicerol activa;
- 35 p) un gen endógeno alterado *glcA* que evita la expresión de una deshidrogenasa de glicerol activa dependiente de NADH; y
- q) una cualquiera de las secuencias de nucleótidos para una estructura artificial pSYCO, SEQ ID NOs:65, 66, 67 ó 68;
- r) una deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato;
- 40 s) una glicerol-3-fosfatasa;
- t) una deshidratasa; y
- u) un factor de reactivación de la deshidratasa;

en donde dicha cepa de *E. coli* es capaz de bioconvertir una fuente adecuada de carbono en glicerol, 1,3-propanodiol o en glicerol y 1,3-propanodiol.

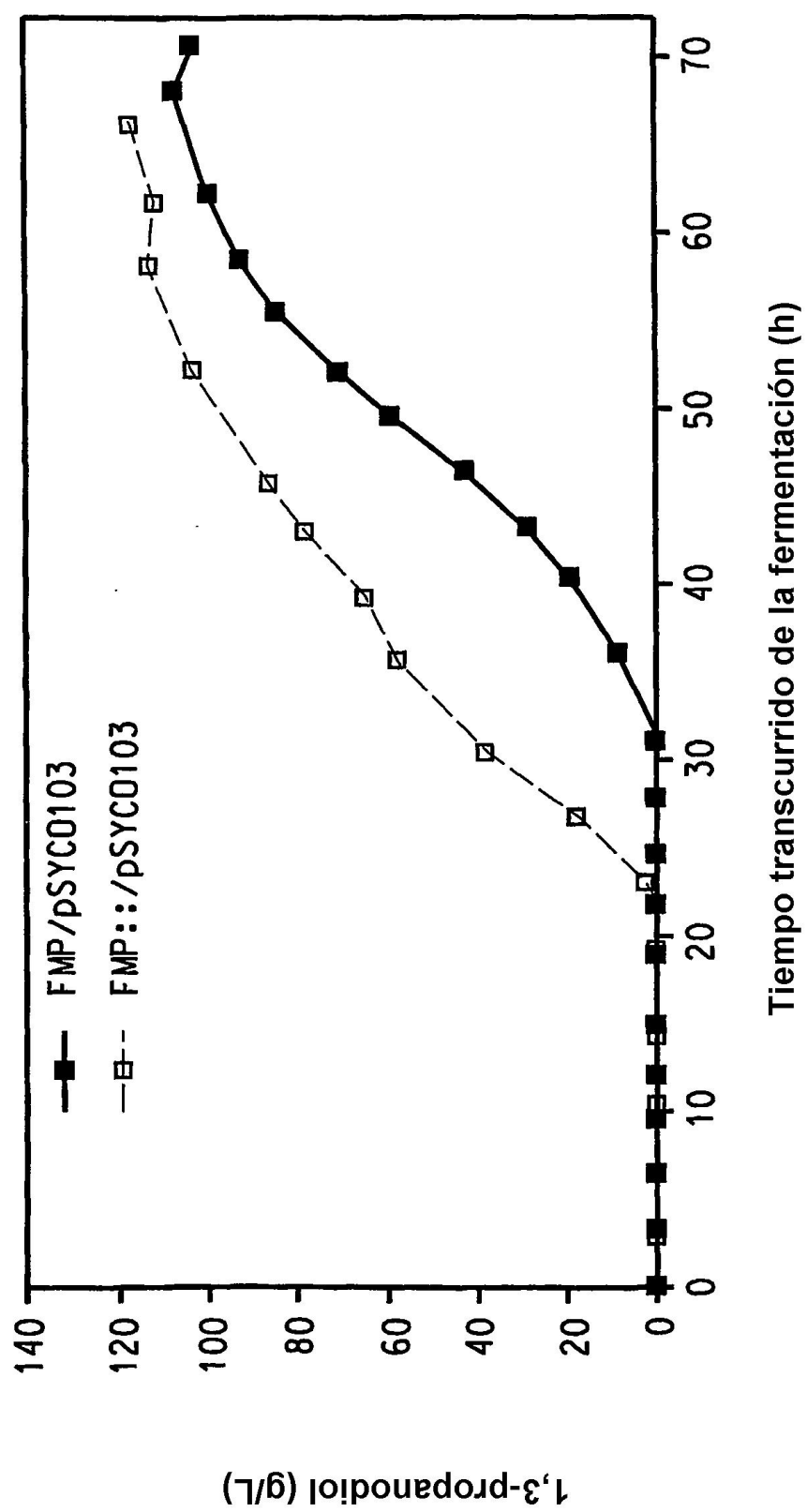


FIG. 1