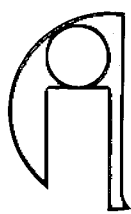


Cm



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-028762- -00000-0000

Fecha: 2014-02-11 16:15:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 184

186

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____
MICROORGANISMO RECOMBINANTE PARA LA PRODUCCION
DE METABOLITOS UTILES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE SCIENTIST OF FORTUNE S.A. _____

DOMICILIO LUXEMBURGO, LUXEMBURGO _____

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén _____

22. BOGOTÁ, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

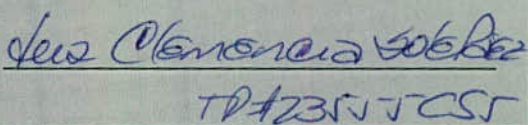


No. 14-028762- -00000-0000

Fecha: 2014-02-11 16:15:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 184

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2012/063685	Fecha 2012/07/12
Publicación Internacional No.		WO 2013/007786 A1	Fecha 2013/01/17
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
MICROORGANISMO RECOMBINANTE PARA LA PRODUCCION DE METABOLITOS UTILES			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C12N 009/000, C12N 009/004, C12N 009/012, C12N 009/088, C12P 007/028			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
SCIENTIST OF FORTUNE S.A.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		7a, rue des Glacis, L-1628 Luxemburgo	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Luxemburgo	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Luxemburgo	Luxemburgo
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. MARLIERE		Philippe	Francés
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Bélgica		Mouscron	173, Rue de Rollegheem, B-7700 Mouscron, Bélgica.
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
De Páez		Luz Clemencia	C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN		Carrera 4ª No. 72-35	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
PAÍS		COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
EUROPA		EP	11173563.5
			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
			2011/07/12

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° <u>14-0012777</u> N° <u>14-0012757</u>	Fecha <u>2014/02/04</u> Fecha <u>2014/02/04</u>
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma 	
C.C 35.456.344 de Usaquén		Tarjeta Profesional 23.555	

MMS\MM5\NCA\ID-AF259969\WPC20138

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 117 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 17 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 2 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de SCIENTIST OF FORTUNE S.A. 10. ☒ (1) Un Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$515.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 7 reivindicaciones adicionales a 10 por \$217.000

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 January 2013 (17.01.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/007786 A1

- (51) **International Patent Classification:**
C12N 9/04 (2006.01) C12P 7/28 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/EP2012/063685
- (22) **International Filing Date:**
12 July 2012 (12.07.2012)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
11173563.5 12 July 2011 (12.07.2011) EP
- (71) **Applicant (for all designated States except US):** SCIENT-
IST OF FORTUNE S.A. [LU/LU]; 7a, rue des Glacis, L-
1628 Luxembourg (LU).
- (72) **Inventor; and**
- (75) **Inventor/Applicant (for US only):** MARLIERE, Philippe
[FR/BE]; 173, Rue de Rollegem, B-7700 Mouscron (BE).
- (74) **Agent:** VOSSIUS & PARTNER; Siebertstraße 4, 81675
München (DE).
- (81) **Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available):** AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available):** ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
- with international search report (Art. 21(3))
 - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2013/007786 A1

(54) **Title:** RECOMBINANT MICROORGANISM FOR THE PRODUCTION OF USEFUL METABOLITES

(57) **Abstract:** Described are recombinant microorganisms characterized by having phosphoketolase activity, having a diminished or inactivated Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMPP) by inactivation of the gene(s) encoding phosphofructokinase or by reducing phosphofructokinase activity as compared to a non-modified microorganism and having a diminished or inactivated oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP) by inactivation of the gene(s) encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase or by reducing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity as compared to a non-modified microorganism. These microorganisms can be used for the production of useful metabolites such as acetone, isobutene or propene.

MICROORGANISMO RECOMBINANTE PARA LA PRODUCCION DE
METABOLITOS UTILES

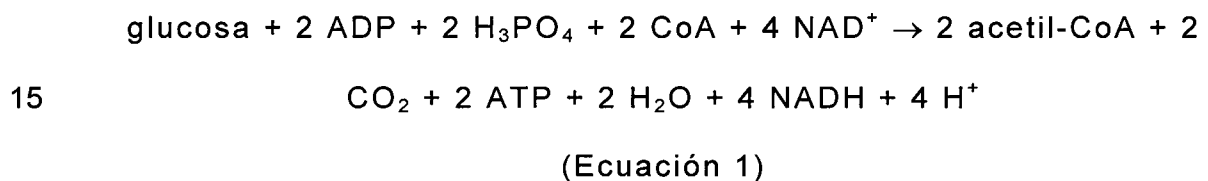
5 La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante caracterizado por tener actividad de fosfoacetolasa, por tener una ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada (EMPP) por inactivación del gen o genes que codifican para la fosfofructocinasa o por reducción de la actividad de
10 fosfofructocinasa en comparación con un microorganismo no modificado o que no posee actividad de fosfofructocinasa y que tiene un ramal oxidativo disminuido o inactivado de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o por reducción de la glucosa-6-
15 fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado o que no posee actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Dicho microorganismo se puede utilizar para la producción de metabolitos útiles tales como acetona, isobuteno o propeno.

20 Desde hace varias décadas, los practicantes de la ingeniería del metabolismo se han esforzado en proveer soluciones biológicas para la producción de productos químicos, proveyendo, por lo tanto, alternativas a los procedimientos químicos más tradicionales. En general, las soluciones biológicas permiten la
25 utilización de materiales de abastecimiento renovables (por ejemplo

azúcares) y compiten con los procedimientos basados en materiales petroquímicos existentes. Una solución biológica, de pasos múltiples para la producción de un producto químico típicamente comprende un microorganismo como el catalizador para la conversión del material de abastecimiento hasta una molécula objetivo. Un conjunto completo de reacciones enzimáticas para la producción de una molécula objetivo particular se puede agrupar en aquellas que pertenecen a rutas de carbono central y aquellas que pertenecen a la ruta específica de producto. Las reacciones que pertenecen a la ruta de carbono central y la ruta específica de producto están relacionadas en el sentido que las restricciones de redox (típicamente, NAD(P)H) y energéticas (típicamente, ATP) de todas y cada una de las reacciones enzimáticas deben ser tomadas en cuenta en un balance general que contribuye a la competitividad del proceso. Históricamente, las rutas de carbono central de los heterótrofos que crecen en azúcares han sido descritas como la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMPP), la ruta del fosfato de pentosa (PPP), la ruta Entner-Doudoroff (EDP), y la ruta de fosfocetolasa (PKP) (véase Gottschalk (1986), *Bacterial Metabolism*, 2ª Edición, Springer-Verlag. New York). Cada ruta central o combinaciones de rutas centrales ofrecen ventajas y desventajas con respecto a una molécula objetivo específica. Con el fin de proveer bioprocesos competitivos, se han descrito microorganismos recombinantes con modificaciones que implican las EMPP, PPP y EDP (M. Emmerling et al., *Metab. Eng.* 1:117 (1999); L. O. Ingram et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2420

(1987); C. T. Trinh et al., Appl. Environ. Microbiol. 74:3634 (2008)).
 Más recientemente, se han descrito microorganismos recombinantes
 con modificaciones que implican la PKP (véase Sonderegger et al.
 Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004), 2892-2897, Patente E.U.A.
 5 7,253,001, Chinen et al. J. Biosci. Bioeng. 103 (2007), 262-269,
 Patente E.U.A. 7,785,858; Fleige et al., Appl. Microbiol. Cell Physiol.
 91 (2011), 769-776).

La EMPP convierte 1 mol de glucosa en 2 moles de
 piruvato (PYR). Cuando se desea acetyl-CoA, 1 mol de PYR puede
 10 ser convertida en 1 mol de acetyl-CoA con la generación concomitante
 de 1 mol de CO₂ y 1 mol de NADH. La suma de las reacciones se da
 en la ecuación 1.



La PPP provee los medios para convertir 1 mol de glucosa
 en 1 mol de CO₂ y 2 moles de NADPH, con la generación
 20 concomitante de 0.67 moles de fructosa-6-fosfato (F6P) y 0.33 moles
 de gliceraldehído-3-fosfato (GAP). El F6P y GAP formados de esta
 manera deben ser metabolizados por otras rutas de reacción, por
 ejemplo por la EMPP. La EDP convierte 1 mol de glucosa en 1 mol de
 GAP y 1 mol de PYR con la generación concomitante de 1 mol de
 25 NADPH. Al igual que con la PPP, el GAP formado de esta manera

debe ser metabolizado por otras rutas de reacción. La PKP provee los medios para convertir 1 mol de glucosa en 1 mol de GAP y 1.5 mol de fosfato de acetilo (AcP). Cuando se desea acetil-CoA, 1 equivalente de AcP más 1 equivalente de coenzima A (CoA) pueden ser convertidos en 1 equivalente de acetil-CoA y 1 equivalente de fosfato inorgánico (Pi) por la acción de la fosfotransacetilasa.

Para moléculas objetivo específicas derivadas a partir de porciones de AcCoA generadas a través de la PKP y casi neutralidad redox a las porciones AcCoA, existe una deficiencia en el balance de energía global. La PKP (y, de manera similar, la PPP y la EDP) no genera ATP para la conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato. En el caso de la captación de glucosa dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP), el PEP debe ser generado por otros medios, por ejemplo a través de la EMPP. El reciclado del GAP a través de la PKP exacerba el problema, particularmente cuando la ruta específica de producto provee poco ATP. Sonderegger (loc. cit.) y Patente E.U.A. 7,253,001 describen cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* que comprenden actividad de fosfocetolasa original o sobre-expresada junto con fosfotransacetilasa sobre-expresada para incrementar el rendimiento en la conversión de mezclas de glucosa/xilosa hasta etanol. Estas cepas presentan captación de glucosa independiente de PEP en la que tanto la EMPP como la PPP son operativas.

Chinen (loc. cit.) y Patente E.U.A. 7,785,858 describen una bacteria recombinante que se selecciona a partir del grupo que consiste de la familia Enterobacteriaceae, la bacteria *Corynebacterium*, y

la bacteria *Bacillus* que comprende actividad incrementada de fosfoacetolasa para la conversión de glucosa hasta las moléculas objetivo las cuales se producen a través de la acetil-CoA intermediaria, incluyendo el grupo que consiste de ácido L-glutámico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, L-cisteína, succinato y polihidroxibutirato. Estas cepas presentan captación de glucosa dependiente de PEP con la EMPP operativa. De manera notable, la actividad de fosfofructocinasa en la bacteria de la Patente E.U.A. 7,785,858 está reducida en comparación con la de una cepa de tipo silvestre o no modificar (véase página 33).

El que un microorganismo particular utilice captación de glucosa independiente de PEP o captación de glucosa dependiente de PEP impacta el balance energético global de un proceso. Por ejemplo, las cepas de *S. cerevisiae* emplean de manera natural la captación de glucosa independiente de PEP mientras que las cepas de *Escherichia coli* emplean de manera natural la captación de glucosa dependiente de PEP. Se han descrito cepas de *E. coli* en las cuales la captación de glucosa dependiente de PEP ha sido reemplazada con captación de glucosa independiente de PEP. Flores et al. (Metabolic Engineering (2005) 7, 70-87) y Patente E.U.A. 7,371,558. En particular, la Patente E.U.A. 7,371,558 describe la modificación de la captación de glucosa para incrementar el rendimiento en la conversión de glucosa a 1,3-propanodiol. Las cepas presentan captación de glucosa independiente de PEP en la que tanto la EMPP como la PPP son operativas, de manera notable sin

actividad de fosfocetolasa presente.

Existe la necesidad de desarrollar microorganismos recombinantes, que comprendan rutas de carbono central y rutas específicas de producto que lleven al máximo la conversión de material de abastecimiento hasta producto acomodando de manera adecuada las restricciones redox y energéticas de las reacciones de las enzimas. Los Solicitantes han resuelto esta necesidad proveyendo las modalidades como se definen en las reivindicaciones.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un microorganismo recombinante caracterizado por:

a) tener actividad de fosfocetolasa;

b) (i) tener una ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican para fosfofructocinasa o por reducción de la actividad de fosfofructocinasa en comparación con un microorganismo no modificado; o

(ii) no poseer actividad de fosfofructocinasa

y

c) (i) tener un ramal oxidativo disminuido o inactivado de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o por reducir la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado; o

(ii) no poseer actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

El microorganismo de conformidad con la presente invención está caracterizado por tener actividad de fosfocetolasa, para incrementar el flujo de acetil-CoA producida. Usualmente, un microorganismo convierte la glucosa a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas en piruvato el cual después puede ser convertido en acetil-CoA por la enzima piruvato deshidrogenasa. Sin embargo, esta conversión está acompañada por la liberación de CO₂ y, por lo tanto, se pierde un átomo de carbono del cual podría haber sido utilizado en la producción de metabolitos útiles. Con el fin de incrementar la cantidad de acetil-CoA en un microorganismo es por lo tanto deseable que la acetil-CoA se forme a través de una ruta diferente para evitar la pérdida de átomos de carbono. Mediante el uso de un microorganismo que tenga actividad de fosfocetolasa, el fosfato y la fructosa-6-fosfato se convierten en eritrosa-4-fosfato y fosfato de acetilo y la fosfotransacetilasa convierte posteriormente el fosfato de acetilo en acetil-CoA sin pérdida de un átomo de carbono. Por lo tanto, al final, el rendimiento de acetil-CoA se puede incrementar utilizando un microorganismo que tenga actividad de fosfocetolasa. Dicho microorganismo es capaz de convertir la glucosa en acetil-CoA sin pérdida de un átomo de carbono. Los microorganismos recombinantes en los cuales una fosfocetolasa es expresada de manera natural o en forma heteróloga se describen en los documentos US 7,785,858 y US 7,253,001.

El término "actividad de fosfocetolasa" tal como se utiliza en la presente invención significa una actividad enzimática que es

5



Las primeras fosfocetolasas usualmente están
15 clasificadas en EC 4.1.2.9 y las últimas en EC 4.1.2.22. Ambos tipos
de fosfocetolasas se pueden utilizar en el alcance de la presente
invención. La Figura 1 muestra esquemas para las reacciones
generales utilizando las dos opciones de la fosfocetolasa como se
describe en la presente solicitud. Esta actividad enzimática se puede
20 medir utilizando pruebas conocidas en la técnica. Un ejemplo para
dicha prueba se da en la sección de Ejemplos más adelante. En el
contexto de la presente invención, un microorganismo que tiene
actividad de fosfocetolasa puede ser, por ejemplo, un microorganismo
el cual de manera natural tiene actividad de fosfocetolasa o un
25 microorganismo que de manera natural no tiene actividad de

fosfocetolasa y que ha sido genéticamente modificado para que exprese una fosfocetolasa o un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fosfocetolasa y el cual ha sido genéticamente modificado, por ejemplo transformado con un ácido nucleico, por ejemplo un vector, que codifica para una fosfocetolasa con el fin de incrementar la actividad de fosfocetolasa en dicho microorganismo. Los microorganismos que de manera inherente, es decir de manera natural, tienen actividad de fosfocetolasa son conocidos en la técnica y se puede utilizar cualquiera de los mismos en el contexto de la presente invención.

También es posible en el contexto de la presente invención que el microorganismo sea un microorganismo que de manera natural no tiene actividad de fosfocetolasa pero que se modifica genéticamente para que comprenda una secuencia de nucleótido que permita la expresión de una fosfocetolasa. De manera similar, el microorganismo también puede ser un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fosfocetolasa pero que se modifica genéticamente para incrementar la actividad de fosfocetolasa, por ejemplo mediante la introducción de una secuencia de nucleótido exógena que codifica para una fosfocetolasa. La modificación genética de microorganismos para expresar una enzima de interés se describe con mayor detalle más adelante.

La fosfocetolasa expresada en el microorganismo de conformidad con la invención puede ser cualquier fosfocetolasa, en particular una fosfocetolasa proveniente de organismos procariotas o

eucariotas. Las fosfocetolasas procariotas se describen, por ejemplo, de *Lactococcus lactis* y se da un ejemplo en la sección de Ejemplos.

En una modalidad preferida de la presente invención la fosfocetolasa es una enzima que comprende una secuencia de aminoácido como la codificada por SQ0005 mostrada en la sección de Ejemplos o una secuencia que es por lo menos "n"% idéntica a dicha secuencia de aminoácido y que tiene la actividad de una fosfocetolasa en la que "n" es un número entero entre 10 y 100, de preferencia 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99. De preferencia, el grado de identidad se determina comparando la secuencia respectiva con la secuencia de aminoácido de cualquiera de las SEQ ID Nos antes mencionadas. Cuando las secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, el grado de identidad de preferencia se refiere ya sea al porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia más larga o al porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia más larga que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia más corta. El grado de identidad de secuencia se puede determinar de conformidad con métodos bien conocidos en la técnica utilizando de preferencia algoritmos de computadora apropiados tales como CLUSTAL.

Cuando se utiliza el método de análisis para determinar si una secuencia particular es o no, por ejemplo, 80% idéntica a una secuencia de referencia se pueden utilizar parámetros

predeterminados o los parámetros de preferencia son los siguientes:
Matriz: blosum 30; castigo por espacio abierto: 10.0; castigo por
espacio extendido: 0.05; divergente de retraso: 40; distancia de
separación de espacio: 8 para comparaciones de secuencias de
5 aminoácido. Para comparaciones de secuencia de nucleótido, el
castigo por espacio extendido de preferencia se ajusta a 5.0.

De preferencia, el grado de identidad se calcula a través
de la longitud completa de la secuencia.

La fosfocetolasa expresada en el microorganismo de
10 conformidad con la invención puede ser una fosfocetolasa que ocurra
de manera natural o ésta puede ser una fosfocetolasa que se obtiene
a partir de una fosfocetolasa que ocurre de manera natural, por
ejemplo mediante la introducción de mutaciones u otras alteraciones
las cuales, por ejemplo, alteran o mejoran la actividad enzimática, la
15 estabilidad, etc.

Los métodos para modificar y/o mejorar las actividades
enzimáticas deseadas de proteínas son bien conocidos para el
experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, mutagénesis aleatoria
o mutagénesis dirigida a sitio y la selección subsiguiente de enzimas
20 que tienen las propiedades deseadas o estrategias de la denominada
"evolución dirigida".

Por ejemplo, para modificación genética en células
procariotas, se puede introducir una molécula de ácido nucleico que
codifica para la fosfocetolasa en plásmidos que permiten la
25 mutagénesis o modificación de secuencia mediante recombinación de

secuencias de ADN. Los métodos estándar (véase Sambrook y Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.) permiten que se efectúen intercambios de base o que se puedan agregar secuencias naturales o sintéticas. Los fragmentos de ADN se pueden ligar utilizando adaptadores y enlazadores complementarios a los fragmentos. Asimismo, se pueden utilizar medidas de ingeniería que provean sitios de restricción apropiados o que eliminen ADN o sitios de restricción sobrantes. En aquellos casos, en los cuales son posibles inserciones, deleciones o sustituciones, se puede utilizar mutagénesis *in vitro*, "reparación de iniciador", restricción o ligación. En general, se efectúan como métodos de análisis un análisis de secuencia, análisis de restricción y otros métodos de bioquímica y biología molecular. Las variantes de fosfocetolasa resultantes después se evalúan respecto a la actividad deseada, por ejemplo, actividad enzimática, con una prueba como la descrita anteriormente y en particular respecto a sus actividades de enzima incrementadas.

Como se describió anteriormente, el microorganismo de la invención puede ser un microorganismo que ha sido genéticamente modificado mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica para una fosfocetolasa. Por lo tanto, en una modalidad preferida, el microorganismo recombinante es un microorganismo recombinante que ha sido genéticamente modificado para que tenga una actividad incrementada de fosfocetolasa. Esto se puede lograr por ejemplo transformando el microorganismo con un

ácido nucleico que codifica para una fosfocetolasa. Más adelante se provee una descripción detallada de la modificación genética de microorganismos. De preferencia, la molécula de ácido nucleico introducida dentro del microorganismo es una molécula de ácido nucleico que es heteróloga con respecto al microorganismo, es decir ésta no ocurre de manera natural en dicho microorganismo.

En el contexto de la presente invención, una "actividad incrementada" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la fosfocetolasa en el microorganismo modificado genéticamente es por lo menos 10%, de preferencia por lo menos 20%, de manera más preferida por lo menos 30% ó 50%, de manera incluso más preferida por lo menos 70% u 80% y particularmente preferido por lo menos 90% ó 100% más alta que en el microorganismo no modificado correspondiente. En modalidades incluso más preferidas el incremento en la expresión y/o actividad puede ser por lo menos 150%, por lo menos 200% o por lo menos 500%. En modalidades particularmente preferidas la expresión es por lo menos 10 veces, de manera más preferida por lo menos 100 veces e incluso más preferido por lo menos 1000 veces más alta que en el microorganismo no modificado correspondiente.

El término expresión/actividad "incrementada" también cubre la situación en la cual el microorganismo no modificado correspondiente no expresa una enzima correspondiente, por ejemplo fosfocetolasa, de modo tal que la expresión/actividad correspondiente en el microorganismo no modificado es cero.

Los métodos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula son bien conocidos por el experto en la técnica. En una modalidad, la medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad de la proteína correspondiente. Los
5 métodos correspondientes son bien conocidos por el experto en la técnica e incluyen Western Blot, ELISA etc. En otra modalidad la medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad del ARN correspondiente. Los métodos correspondientes son bien conocidos por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo,
10 Northern Blot.

Los métodos para medir la actividad enzimática de la fosfocetolasa son conocidos en la técnica y ya se describieron anteriormente.

El microorganismo de conformidad con la presente
15 invención también se caracteriza por tener una ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican para una fosfofructocinasa o por reducción de la actividad de fosfofructocinasa en comparación con un microorganismo no modificado o por no poseer actividad de
20 fosfofructocinasa. Por lo tanto, el microorganismo es cualquiera de un microorganismo que de manera natural tiene una EMPP que incluye actividad de fosfofructocinasa pero que ha sido modificado, en particular modificado genéticamente, de modo tal que la actividad de fosfofructocinasa esté ya sea completamente eliminada o de modo
25 tal que ésta esté reducida en comparación con el microorganismo no

modificado correspondiente, o el microorganismo es un microorganismo que de manera natural no posee una actividad de fosfofructocinasa.

Como ya se mencionó anteriormente, cuando la glucosa es procesada a través de la EMPP hasta acetil-CoA, se pierde un átomo de carbono por la liberación de CO_2 en el último paso. Esta pérdida se puede evitar mediante la introducción de la fosfocetolasa. Debido a que la fructosa-6-fosfato es un sustrato para la fosfocetolasa, es deseable que la reserva de fructosa-6-fosfato se mantenga a un nivel alto en el microorganismo con el fin de incrementar el rendimiento en acetil-CoA. Debido a que la fructosa-6-fosfato también es un sustrato para una enzima de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, es decir la fosfofructocinasa, el microorganismo recombinante de la presente invención tiene una actividad reducida de fosfofructocinasa en comparación con un microorganismo no modificado o el gen o genes que codifican para una fosfofructocinasa ha/han sido inactivado(s). Esto asegura que el flujo de fructosa-6-fosfato esté dirigido a la fosfocetolasa y a la producción de acetil-CoA sin pérdida de CO_2 debido a que la fructosa-6-fosfato o la mayoría de fructosa-6-fosfato ya no puede ser procesada a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas. Los microorganismos recombinantes en los cuales una fosfocetolasa es expresada en forma natural o en forma heteróloga y los cuales tienen actividad reducida de fosfofructocinasa se describen en el documento US 7,785,858.

La "actividad de fosfofructocinasa" significa una actividad enzimática que convierte el ATP y la fructosa-6-fosfato hasta ADP y fructosa-1,6-bisfosfato (EC 2.7.1.11). Esta actividad enzimática se puede medir utilizando pruebas conocidas en la técnica como es descrito, por ejemplo, por Kotlarz et al. (Methods Enzymol. (1982) 90, 60-70).

El término "un microorganismo que se caracteriza por tener una ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican para una fosfofructocinasa o por reducción de la actividad de fosfofructocinasa en comparación con un microorganismo no modificado" de preferencia se refiere a un microorganismo en el cual la inactivación del gen o genes que codifican para una fosfofructocinasa o la reducción de la actividad de fosfofructocinasa en comparación con un microorganismo no modificado se logra mediante una modificación genética del microorganismo que lleva a dicha inactivación o reducción.

En una modalidad preferida, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene una ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) inactivada por inactivación del gen o genes que codifican para una fosfofructocinasa. La inactivación del gen o genes que codifican para una fosfofructocinasa en el contexto de la presente invención significa que el gen o genes que codifican para fosfofructocinasa que están presentes en el microorganismo está

(están) inactivados de modo tal que éstos ya no son expresados y/o ya no llevan a la síntesis de fosfofructocinasa funcional. La inactivación se puede lograr mediante muchas maneras diferentes conocidas en la técnica. La inactivación se puede lograr, por ejemplo, mediante la alteración del gen o genes que codifican para la fosfofructocinasa o mediante delección limpia de dicho(s) gen(es) a través de la introducción de un marcador de selección. De manera alternativa, el promotor del gen o genes que codifican para la fosfofructocinasa se puede mutar en una manera en la que el gen ya no sea transcrito como ARNm. Otras maneras para inactivar el gen o genes que codifican para la fosfofructocinasa conocidas en la técnica son: expresar un polinucleótido que codifica para ARN que tiene una secuencia de nucleótido complementaria al transcrito del gen o genes de fosfofructocinasa de modo tal que el ARNm ya no pueda ser traducido como una proteína; expresar un polinucleótido que codifica para ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de ARNi; expresar un polinucleótido que codifica para ARN que tenga una actividad de cortar específicamente un transcrito de dicho gen o genes; o expresar un polinucleótido que codifica para ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de co-supresión. Estos polinucleótidos se pueden incorporar en un vector, el cual se puede introducir dentro del microorganismo mediante transformación para lograr la inactivación del gen o genes que codifican para la fosfofructocinasa.

El término "inactivación" en el contexto de la presente

invención de preferencia significa inactivación completa, es decir que el microorganismo no muestra actividad de fosfofructocinasa. Esto significa en particular que el microorganismo no muestra actividad de fosfofructocinasa independiente de las condiciones de crecimiento
5 utilizadas. De preferencia, "inactivación" significa que el gen o genes que codifican para fosfofructocinasa que están presentes en el microorganismo están genéticamente modificados para evitar la expresión de la enzima. Esto se puede lograr, por ejemplo mediante delección del gen o partes del mismo en la cual la delección de las
10 partes del mismo evita la expresión de la enzima, o mediante alteración del gen ya sea en la región codificadora o en la región de promotor en la cual la alteración tiene el efecto de que no se exprese proteína o que se exprese una proteína disfuncional.

En una modalidad preferida, el microorganismo
15 recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene una ruta de Embden-Meyerhof-Parnas(EMPP) disminuida por reducción de la actividad de fosfofructocinasa en comparación con un microorganismo no modificado. De preferencia, esta reducción se logra mediante una modificación genética del
20 microorganismo. Esto se puede lograr por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida a sitio del promotor y/o la enzima y selección subsiguiente de los promotores y/o enzimas que tienen las propiedades deseadas o mediante secuencias de nucleótido complementarias o efecto de ARNi como se describió
25 anteriormente. Más adelante se provee una descripción detallada de

la modificación genética de microorganismos.

En el contexto de la presente invención, una "actividad reducida" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la fosfofructocinasa, en el microorganismo genéticamente modificado es por lo menos 10%, de preferencia por lo menos 20%, de manera más preferida por lo menos 30% ó 50%, de manera incluso más preferida por lo menos 70% u 80% y particularmente preferido por lo menos 90% ó 100% más baja que en el microorganismo no modificado correspondiente. Los métodos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula son bien conocidos por el experto en la técnica. Las pruebas para medir la actividad enzimática reducida de una fosfofructocinasa son conocidas en la técnica.

En otra modalidad el microorganismo de conformidad con la presente invención es un microorganismo que no posee una actividad de fosfofructocinasa. Esto de preferencia significa que dicho microorganismo no posee de manera natural una actividad de fosfofructocinasa. Esto significa que dicho microorganismo no contiene de manera natural en su genoma una secuencia de nucleótido que codifica para una enzima con actividad de fosfofructocinasa. Los ejemplos para dichos microorganismos son *Zymomonas mobilis* (J. S. Suo et al., Nat. Biotechnol. 23:63 (2005)) y *Ralstonia eutropha* (C. Fleige et al., Appl. Microb. Cell Physiol. 91:769 (2011)).

El microorganismo de conformidad con la presente

28
24

invención también se caracteriza por tener un ramal oxidativo disminuido o inactivado de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o por reducción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado o por no poseer actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Por lo tanto, el microorganismo es cualquiera de un microorganismo que de manera natural tiene una PPP que incluye actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa pero que ha sido modificado, en particular modificado genéticamente, de modo tal que la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa esté ya sea completamente eliminada o de modo tal que ésta esté reducida en comparación con el microorganismo no modificado correspondiente, o el microorganismo es un microorganismo que de manera natural no posee una actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Disminuir o inactivar el ramal oxidativo de la ruta de fosfato de pentosa incrementa adicionalmente el rendimiento en acetil-CoA debido a que la glucosa-6-fosfato ya no será extraída a través del ciclo de fosfato de pentosa. Toda o casi toda la glucosa-6-fosfato en el microorganismo será convertida en fructosa-6-fosfato la cual después será convertida adicionalmente en acetil-CoA.

La "actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa" significa una actividad enzimática que convierte glucosa-6-fosfato y NADP⁺ en 6-fosfoglucono-5-lactona y NADPH (EC 1.1.1.49). Esta actividad enzimática se puede medir utilizando pruebas conocidas en

26
25

la técnica como las descritas, por ejemplo, por Noltmann et al. (J. Biol. Chem. (1961) 236, 1225-1230).

El término "un microorganismo que se caracteriza por tener un ramal oxidativo disminuido o inactivado de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o por reducción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado" de preferencia se refiere a un microorganismo en el cual la inactivación del gen o genes que codifican para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o la reducción de la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado se logra mediante una modificación genética del microorganismo que lleva a dicha inactivación o reducción.

En una modalidad preferida, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene un ramal oxidativo inactivado de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifican para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La inactivación del gen o genes que codifican para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el contexto de la presente invención significa que el gen o genes que codifican para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que está (están) presente(s) en el microorganismo está (están) inactivados de modo tal que éstos ya no son expresados y/o ya no llevan a la síntesis de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa funcional. La inactivación se puede lograr mediante muchas maneras

diferentes conocidas en la técnica. La inactivación se puede lograr, por ejemplo, mediante la alteración del gen o genes que codifican para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o mediante delección limpia de dicho gen o genes a través de la introducción de un marcador de selección. De manera alternativa, el promotor del gen o genes que codifican para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se puede(n) mutar en una manera que el gen o genes ya no sea/sean transcrito(s) como ARNm. Otras maneras para inactivar el gen o genes que codifican para la fosfofructocinasa conocidas en la técnica son: expresar un polinucleótido que codifica para ARN que tiene una secuencia de nucleótido complementaria al transcrito del gen o genes de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de modo tal que el ARNm ya no pueda ser traducido como una proteína, expresar un polinucleótido que codifica para ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de ARNi; expresar un polinucleótido que codifica para ARN que tenga una actividad de cortar específicamente un transcrito de dicho gen o genes; o expresar un polinucleótido que codifica para ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de co-supresión. Estos polinucleótidos se pueden incorporar en un vector, el cual se puede introducir dentro del microorganismo mediante transformación para lograr la inactivación del gen o genes que codifican para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El término "inactivación" en el contexto de la presente invención de preferencia significa inactivación completa, es decir que el microorganismo no muestra actividad de glucosa-6-

fosfato deshidrogenasa. Esto significa en particular que el microorganismo no muestra actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa independiente de las condiciones de crecimiento utilizadas.

5 De preferencia, "inactivación" significa que el gen o genes que codifican para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa los cuales están presentes en el microorganismo están genéticamente modificados para evitar la expresión de la enzima. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante delección del gen o partes del mismo en la cual la
10 delección de partes del mismo evita la expresión de la enzima, o mediante alteración del gen ya sea en la región codificadora o en la región de promotor en la cual la alteración tiene el efecto de que no se expresa proteína o que se exprese una proteína disfuncional.

En una modalidad preferida, el microorganismo
15 recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene un ramal oxidativo disminuido de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por reducción de la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado. De preferencia, esta reducción se logra mediante una
20 modificación genética del microorganismo. Esto se puede lograr por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida a sitio del promotor y/o la enzima y selección subsiguiente de los promotores y/o enzimas que tienen las propiedades deseadas o mediante secuencias de nucleótido complementarias o efecto de
25 ARNi como se describió anteriormente. Más adelante se provee una

descripción detallada de la modificación genética de microorganismos.

En el contexto de la presente invención, una "actividad reducida" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en el microorganismo genéticamente modificado es por lo menos 10%, de preferencia por lo menos 20%, de manera más preferida por lo menos 30% ó 50%, de manera incluso más preferida por lo menos 70% u 80% y particularmente preferido por lo menos 90% ó 100% más baja que en el microorganismo no modificado correspondiente. Los métodos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula son bien conocidos por el experto en la técnica. Las pruebas para medir la actividad enzimática reducida de una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son conocidas en la técnica.

En otra modalidad el microorganismo de conformidad con la presente invención es un microorganismo que no posee una actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esto de preferencia significa que dicho microorganismo no posee de manera natural una actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esto significa que dicho microorganismo no contiene de manera natural en su genoma una secuencia de nucleótido que codifica para una enzima con actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Los ejemplos para dichos microorganismos son *Acinetobacter baylyi* (Barbe et al., Nucl. Acids Res. 32 (2004), 5766-5779), archae del phylum hipertermofílico tal como *Sulfolobus solfataricus* (Nunn et al., J. Biol. Chem. 285

(2010), 33701-33709), *Thermoproteus tenax*, *Thermoplasma acidophilum* y *Picrophilus torridus* (Reher y Schonheit, FEBS Lett. 580 (2006), 1198-1204).

En una modalidad adicional, el microorganismo de
5 conformidad con la presente invención también se caracteriza por
tener actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, de preferencia
cuando crece en glucosa. La fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa es una
enzima que participa en la gluconeogénesis hidrolizando fructosa-1,6-
bisfosfato en fructosa-6-fosfato y fosfato libre. Sin embargo,
10 básicamente en todos los organismos en presencia de glucosa, la
actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa está reprimida y la
glucosa se procesa a través de EMPP (glucólisis). El microorganismo
de la presente invención, el cual tiene actividad de fosfocetolasa y el
cual no posee actividad de fosfofructocinasa o en el cual la actividad
15 de fosfofructocinasa está reducida o cuyo gen que codifica para la
fosfofructocinasa está inactivado, el rendimiento de acetil-CoA por
conversión de fructosa-6-fosfato con la fosfocetolasa (EC 4.1.2.9 o
EC 4.1.2.22) se puede incrementar asegurando la presencia de
actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, por ejemplo mediante
20 des-represión de la fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa en presencia de
glucosa. La presencia de actividad de fructosa-1,6-bisfosfato
fosfatasa da como resultado el reciclado de fructosa-1,6-bisfosfato
producida por la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa en fructosa-6-fosfato
la cual después de nuevo se puede convertir a través de la ruta de
25 fosfocetolasa en acetil-CoA. En efecto, el producto fosfato de acetilo

de la fosfocetolasa se interconvierte en acetyl-CoA a través de la acción de la enzima fosfato acetyltransferasa EC 2.3.1.8. Por lo tanto, el microorganismo recombinante de la presente invención es capaz de producir acetyl-CoA a partir de glucosa a una estequiometría que se aproxima a 3:1. La suma de las reacciones se da en la ecuación 2:



(Ecuación 2)

El término "actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa" significa una actividad enzimática que convierte fructosa-1,6-bisfosfato y H_2O en fructosa-6-fosfato y fosfato (EC 3.1.3.11). Esta actividad enzimática se puede medir utilizando pruebas conocidas en la técnica como las descritas, por ejemplo, por Hines et al. (J. Biol. Chem. (2007) 282, 11696-11704). Los términos "actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa" y "fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa" también cubren enzimas que son bifuncionales en el sentido que éstas muestran una actividad de fructosa-1-6-bisfosfato aldolasa/fosfatasa. Dichas enzimas bifuncionales son expresadas en la mayoría de los linajes bacterianos de las archae y que se ramifican profundamente y, en la mayoría de los casos, son estables al calor. Dichas enzimas están reportadas, por ejemplo, para *Thermococcus kodakaraensis*, *Sulfolobus tokodaii*, *Ignicoccus hospitalis*, *Cenarchaeum symbiosum*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermus thermophilus*, *Thermoproteus neutrophilus*, *Moorelia thermoacetica* y

muchas otras (véase, por ejemplo, Say y Fuchs (Nature 464 (2010), 1077); Fushinobu et al. (Nature 478 (2011), 538); Du et al. (Nature 478 (2011), 534).

El término "actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa cuando crece en glucosa" significa que el microorganismo expresa una enzima con actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa cuando el microorganismo se cultiva en glucosa. "Cultivado en glucosa" significa que el microorganismo se cultiva en un medio que contiene, entre otros, glucosa como fuente de carbono. De preferencia, este término significa que el microorganismo se cultiva en un medio que contiene glucosa como la única fuente de carbono.

En el contexto de la presente invención, un microorganismo el cual tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, puede ser, por ejemplo, un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, o un microorganismo que no tiene de manera natural actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, y que ha sido genéticamente modificado para expresar una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa. Este también podría ser un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, y el cual ha sido genéticamente modificado, por ejemplo transformado con un ácido nucleico, por ejemplo un vector, que codifica para una fructosa-1,6-

bisfosfato fosfatasa con el fin de incrementar la actividad de fosfocetolasa en dicho microorganismo.

Los microorganismos que de manera inherente, es decir de forma natural, tienen actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crecen en glucosa, son conocidos en la técnica y se puede utilizar cualquiera de los mismos en el contexto de la presente invención.

También es posible en el contexto de la presente invención que el microorganismo sea un microorganismo que de manera natural no tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato, en particular cuando crece en glucosa, pero que está genéticamente modificado para que sea capaz de expresar una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular, cuando crece en glucosa. Esto se puede lograr, por ejemplo, mutando el promotor del gen que codifica para la fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa en una manera tal que el gen ya no esté reprimido cuando el microorganismo se cultiva en glucosa o el promotor puede ser reemplazado por otro promotor por ejemplo un promotor constitutivo el cual no está regulado cuando el microorganismo se cultiva en glucosa.

De manera similar, el microorganismo también puede ser un microorganismo que de manera natural tiene actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, pero que está genéticamente modificado para mejorar/incrementar la actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en particular cuando crece en glucosa, por ejemplo mediante la introducción de una

secuencia de nucleótido exógena que codifica para una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa.

Más adelante se describe con mayor detalle la modificación genética de microorganismos para expresar una enzima
5 de interés.

La fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa de conformidad con la invención puede ser una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa que ocurra de manera natural o ésta puede ser una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa que se obtiene a partir de una fructosa-1,6-bisfosfato
10 fosfatasa que ocurra de manera natural, por ejemplo mediante la introducción de mutaciones u otras alteraciones las cuales, por ejemplo, alteran o mejoran la actividad enzimática, la estabilidad, etc. Los métodos para modificar y/o mejorar las actividades enzimáticas deseadas de proteínas son bien conocidos por el experto en la
15 técnica y se describieron anteriormente. Las variantes de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa resultantes se evalúan después respecto a sus propiedades, por ejemplo actividad enzimática o regulación. Las pruebas para medir la actividad enzimática de una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa son conocidas en la técnica. En una modalidad la
20 fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa es una enzima la cual no está regulada por inhibición de retroalimentación.

En una modalidad preferida, el microorganismo recombinante ha sido modificado genéticamente para que tenga una actividad incrementada de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa. Esto se
25 puede lograr por ejemplo transformando el microorganismo con un

28/34

ácido nucleico que codifica para una fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa. Más adelante se provee una descripción detallada de la modificación genética de microorganismos.

En el contexto de la presente invención, una "actividad incrementada" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa, en el microorganismo genéticamente modificado cuando crece en glucosa es por lo menos 10%, de preferencia por lo menos 20%, de manera más preferida por lo menos 30% ó 50%, de manera incluso más preferida por lo menos 70% u 80% y particularmente preferido por lo menos 90% ó 100% más alta que en el microorganismo no modificado correspondiente cuando crece en glucosa. En modalidades incluso más preferidas el incremento en la expresión y/o actividad puede ser por lo menos 150%, por lo menos 200% o por lo menos 500%. En modalidades particularmente preferidas la expresión es por lo menos 10 veces, de manera más preferida por lo menos 100 veces e incluso más preferido por lo menos 1000 veces más alta que en el microorganismo no modificado correspondiente en particular cuando crece en glucosa.

Los métodos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula son bien conocidos por el experto en la técnica. En una modalidad, la medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad de la proteína correspondiente. Los métodos correspondientes son bien conocidos por el experto en la técnica e incluyen Western Blot, ELISA etc. En otra modalidad la

26/15

medición del nivel de expresión se hace midiendo la cantidad del ARN correspondiente. Los métodos correspondientes son bien conocidos por el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo. Northern Blot.

- 5 Los métodos para medir la actividad enzimática de la fructosa-1,6-bisfosfato son conocidos en la técnica.

En otra modalidad, el microorganismo de conformidad con la presente invención se caracteriza también porque la EMPP está adicionalmente disminuida o inactivada por inactivación del gen o

10 genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o por reducción de la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado. Disminuir adicionalmente la EMPP en un paso más corriente abajo disminuyendo o inactivando la gliceraldehído-3-

15 fosfato deshidrogenasa asegura que ninguno o casi ninguno del gliceraldehído-3-fosfato que se pudiera producir en el microorganismo sea procesado a través de la glucólisis hasta acetil-CoA con lo cual se perdería un átomo de carbono por la liberación de CO₂ en el último paso catalizado por la piruvato deshidrogenasa. Por

20 lo tanto, bloquear la EMPP disminuyendo o inactivando la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa asegura adicionalmente que el flujo global esté dirigido hacia la fosfocetolasa.

La "actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa" significa una actividad enzimática que convierte gliceraldehído-3-

25 fosfato, fosfato y NAD⁺ en 3-fosfo-D-gliceroil fosfato y NADH + H⁺

(EC 1.2.1.12). Esta actividad se puede medir utilizando pruebas conocidas en la técnica como las descritas, por ejemplo, por D'Alessio et al. (J. Biol. Chem. (1971) 246, 4326-4333).

El término "un microorganismo que se caracteriza por tener una ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) adicionalmente disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican para una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o por reducción de la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado" de preferencia se refiere a un microorganismo en el cual la inactivación del gen o genes que codifican para una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o la reducción de la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado se logra mediante una modificación genética del microorganismo que lleva a dicha inactivación o reducción.

En una modalidad preferida, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante en el cual la EMPP está adicionalmente disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o por reducción de la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado. La inactivación del gen o genes que codifican para una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en el contexto de la presente invención significa que el gen o genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa que está (están) presente(s) en el microorganismo está (están) inactivados de modo tal que éstos ya no son expresados y/o ya no llevan a la síntesis de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa funcional. La inactivación se puede lograr mediante

5 muchas maneras diferentes conocidas en la técnica. La inactivación se puede lograr, por ejemplo, mediante la alteración del gen o genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o mediante delección limpia de dicho gen o genes a través de la introducción de un marcador de selección. De manera alternativa, el

10 promotor del gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se puede mutar en una manera que el gen o genes ya no sea/sean transcrito(s) como ARNm. Otras maneras para inactivar el gen o genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa conocidas en la técnica son: expresar un

15 polinucleótido que codifica para ARN que tiene una secuencia de nucleótido complementaria al transcrito del gen o genes de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de modo tal que el ARNm ya no pueda ser traducido como una proteína, expresar un polinucleótido que codifica para ARN que suprime la expresión de dicho gen o

20 genes a través del efecto de ARNi; expresar un polinucleótido que codifica para ARN que tenga una actividad de cortar específicamente un transcrito de dicho gen o genes; o expresar un polinucleótido que codifica para ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de co-supresión. Estos polinucleótidos se pueden

25 incorporar en un vector, el cual se puede introducir dentro del

microorganismo mediante transformación para lograr la inactivación del gen o genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

El término "inactivación" en el contexto de la presente invención de preferencia significa inactivación completa, es decir que el microorganismo no muestra actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Esto significa en particular que el microorganismo no muestra actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa independiente de las condiciones de crecimiento utilizadas.

De preferencia, "inactivación" significa que el gen o genes que codifican para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa los cuales están presentes en el microorganismo están genéticamente modificados para evitar la expresión de la enzima. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante delección del gen o partes del mismo en la cual la delección de partes del mismo evita la expresión de la enzima, o mediante alteración del gen ya sea en la región codificadora o en la región de promotor en la cual la alteración tiene el efecto de que no se expresa proteína o que se exprese una proteína disfuncional.

En una modalidad preferida, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene una EMPP disminuida por reducción de la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado. De preferencia, esta reducción se logra mediante una modificación genética del microorganismo.

Esto se puede lograr por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida a sitio del promotor y/o la enzima y selección subsiguiente de los promotores y/o enzimas que tienen las propiedades deseadas o mediante secuencias de nucleótido complementarias o efecto de ARNi como se describió anteriormente. Más adelante se provee una descripción detallada de la modificación genética de microorganismos.

En el contexto de la presente invención, una "actividad reducida" significa que la expresión y/o la actividad de una enzima, en particular de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, en el microorganismo genéticamente modificado es por lo menos 10%, de preferencia por lo menos 20%, de manera más preferida por lo menos 30% ó 50%, de manera incluso más preferida por lo menos 70% u 80% y particularmente preferido por lo menos 90% ó 100% más baja que en el microorganismo no modificado correspondiente. Los métodos para medir el nivel de expresión de una proteína dada en una célula son bien conocidos por el experto en la técnica. Las pruebas para medir la actividad enzimática reducida de una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa son conocidas en la técnica.

El término "microorganismo" en el contexto de la presente invención se refiere a bacterias, así como a hongos, tales como levaduras, y también a algas y archaea. En una modalidad preferida, el microorganismo es una bacteria. En principio se puede utilizar cualquier bacteria. Las bacterias preferidas para ser utilizadas en el proceso de conformidad con la invención son bacterias del género

Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Pseudomonas, Zymomonas o Escherichia. En una modalidad particularmente preferida la bacteria pertenece al género Escherichia e incluso más preferido a la especie Escherichia coli. En otra modalidad preferida la bacteria pertenece a la especie Pseudomonas putida o a la especie Zymomonas mobilis o a la especie Corynebacterium glutamicum.

En otra modalidad preferida el microorganismo es un hongo, de manera más preferida un hongo del género Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Aspergillus, Trichoderma, Kluyveromyces o Pichia y de manera incluso más preferida de la especie Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Aspergillus niger, Trichoderma reesei, Kluyveromyces marxianus, Kluyveromyces lactis, Pichia pastoris, Pichia torula o Pichia utilis.

En una modalidad más preferida, en la cual el microorganismo recombinante es una bacteria, el gen o genes que codifican para el transportador de PTS dependiente de PEP han sido inactivados. En el contexto de la presente invención, la inactivación significa que el gen o genes que codifican para transportador de PTS dependiente de PEP que está (están) presente(s) en el microorganismo está (están) inactivados de modo tal que éstos ya no son expresados y/o ya no llevan a la síntesis de transportador de PTS dependiente de PEP funcional. La inactivación del gen o genes que codifican para el transportador de PTS dependiente de PEP debe ser de tal manera que la bacteria ya no sea capaz de transportar glucosa a través del transportador de PTS dependiente de PEP.

Los transportadores de PTS dependiente de PEP (por ejemplo provenientes de *E. coli*, *B. subtilis*) son conocidos en la técnica. Un ejemplo para la inactivación del transportador de PTS dependiente de PEP se muestra en la sección de Ejemplos más adelante.

La inactivación se puede lograr mediante muchas maneras diferentes conocidas en la técnica. La inactivación se puede lograr, por ejemplo, mediante la alteración del gen o genes que codifican para el transportador de PTS dependiente de PEP o mediante delección limpia de dicho gen o genes a través de la introducción de un marcador de selección. De manera alternativa, el promotor del gen o genes que codifican para el transportador de PTS dependiente de PEP se puede mutar en una manera que el gen o genes ya no sea (sean) transcrito(s) como ARNm. Otras maneras para inactivar el gen o genes que codifican para el transportador de PTS dependiente de PEP conocidas en la técnica son: expresar un polinucleótido que codifica para ARN que tiene una secuencia de nucleótido complementaria al transcrito del gen o genes del transportador de PTS dependiente de PEP de modo tal que el ARNm ya no pueda ser traducido como una proteína, expresar un polinucleótido que codifica para ARN que suprime la expresión de dicho gen o genes a través del efecto de ARNi; expresar un polinucleótido que codifica para ARN que tenga una actividad de cortar específicamente un transcrito de dicho gen o genes; o expresar un polinucleótido que codifica para ARN que suprime la expresión de

42
43

dicho gen o genes a través del efecto de co-supresión. Estos polinucleótidos se pueden incorporar en un vector, el cual se puede introducir dentro del microorganismo mediante transformación para lograr la inactivación del gen o genes que codifican para el

5 transportador de PTS dependiente de PEP.

El término "recombinante" significa que el microorganismo de la presente invención está genéticamente modificado de modo tal que contenga una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima como se definió anteriormente en comparación con un

10 microorganismo de tipo silvestre o no modificado o de modo tal que se haya eliminado un gen que codifica para una enzima como se definió anteriormente en comparación con un microorganismo de tipo silvestre o no modificado.

Una molécula de ácido nucleico que codifica para una

15 enzima como se definió anteriormente se puede utilizar sola o como parte de un vector.

Las moléculas de ácido nucleico también pueden comprender secuencias para control de expresión ligadas en forma operable al polinucleótido comprendido en la molécula de ácido

20 nucleico. El término "ligado en forma operativa" o "ligado en forma operable", tal como se utiliza a través de toda la presente descripción, se refiere a un enlace entre una o más secuencias de control de expresión y la región codificadora en el polinucleótido que se va a expresar de tal manera que la expresión se logra bajo

25 condiciones compatibles con la secuencia de control de expresión.

Expresión comprende la transcripción de la secuencia de ADN heteróloga, de preferencia como un ARNm susceptible de traducción. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en hongos así como en bacterias, son bien conocidos por los expertos
5 en la técnica. Estos abarcan promotores, incrementadores, señales de terminación, señales para elección de blanco y similares. Los ejemplos se dan más adelante en conexión con las explicaciones concernientes a los vectores.

Los promotores para uso en conexión con la molécula de
10 ácido nucleico pueden ser homólogos o heterólogos con respecto a su origen y/o con respecto al gen que se va a expresar. Los promotores apropiados son por ejemplo promotores que se prestan por sí mismos a la expresión constitutiva. Sin embargo, también se pueden utilizar promotores que solamente son activados en un punto
15 en el tiempo determinado por influencias externas. En este contexto se pueden utilizar promotores artificiales y/o químicamente inducibles.

Los vectores también pueden comprender secuencias de control de expresión ligadas en forma operable a dichos
20 polinucleótidos contenidos en los vectores. Estas secuencias de control de expresión pueden ser adecuadas para asegurar la transcripción y síntesis de un ARN susceptible de traducción en bacterias u hongos.

Además, es posible insertar diferentes mutaciones dentro
25 de los polinucleótidos utilizando métodos usuales en biología

49
48

molecular (véase por ejemplo Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.), lo que lleva a la síntesis de polipéptidos que posiblemente tienen propiedades biológicas modificadas. La introducción de mutaciones puntuales es concebible en posiciones en las cuales una modificación de la secuencia de aminoácido por ejemplo influye en la actividad biológica o la regulación del polipéptido.

Asimismo, se pueden preparar mutantes que posean una especificidad modificada para sustrato o producto. De preferencia, dichos mutantes muestran una actividad incrementada. De manera alternativa, se pueden preparar mutantes cuya actividad catalítica sea eliminada sin perder actividad de unión al sustrato.

Asimismo, la introducción de mutaciones dentro de los polinucleótidos que codifican para una enzima como se definió anteriormente permite que se reduzca o se incremente la tasa de expresión del gen y/o la actividad de las enzimas codificadas por dichos polinucleótidos.

Para modificar genéticamente las bacterias u hongos, los polinucleótidos que codifican para una enzima como se definió anteriormente o partes de estas moléculas se pueden introducir dentro de plásmidos que permiten la mutagénesis o modificación de secuencia mediante recombinación de secuencias de ADN. Los métodos estándar (véase Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press. Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.) permiten que se puedan efectuar intercambios de bases o

46
25

que se agreguen secuencias naturales o sintéticas. Los fragmentos de ADN se pueden conectar entre sí aplicando adaptadores y enlazadores a los fragmentos. Asimismo, se pueden utilizar medidas de ingeniería que provean sitios de restricción apropiados o que
5 eliminen ADN o sitios de restricción sobrantes. En aquellos casos, en los cuales son posibles inserciones, deleciones o sustituciones, se pueden utilizar mutagénesis *in vitro*, "reparación de iniciador", restricción o ligación. En general, como métodos de análisis se efectúan un análisis de secuencia, análisis de restricción y otros
10 métodos de bioquímica y biología molecular.

Por lo tanto, de conformidad con la presente invención se puede producir un microorganismo recombinante modificando genéticamente hongos o bacterias que comprende introducir los polinucleótidos, moléculas de ácido nucleico o vectores antes
15 descritos dentro de un hongo o bacteria.

La invención se refiere a microorganismos recombinantes, en particular bacterias y hongos, genéticamente modificados con los polinucleótidos, moléculas de ácido nucleico o vectores antes descritos o que se pueden obtener mediante el método antes
20 mencionado para producir bacterias u hongos genéticamente modificados, y a células derivadas de dichas bacterias u hongos transformados y que contienen un polinucleótido, molécula de ácido nucleico o vector como se definió anteriormente. En una modalidad preferida la célula hospedera está genéticamente modificada de tal
25 manera que ésta contiene al polinucleótido integrado de manera

46

estable en el genoma.

El polinucleótido se expresa para llevar a la producción de un polipéptido que tiene cualquiera de las actividades descritas anteriormente. Una revisión de los diferentes sistemas de expresión está contenida por ejemplo en *Methods in Enzymology* 153 (1987), 385-516, en Bitter et al. (*Methods in Enzymology* 153 (1987), 516-544) y en Sawers et al. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 46 (1996), 1-9), Billman-Jacobe (*Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 500-4), Hockney (*Trends in Biotechnology* 12 (1994), 456-463), Griffiths et al., (*Methods in Molecular Biology* 75 (1997), 427-440). Una revisión de los sistemas de expresión en levadura es dada por ejemplo por Hensing et al. (*Antonie van Leeuwenhoek* 67 (1995), 261-279), Bussineau et al. (*Developments in Biological Standardization* 83 (1994), 13-19), Gellissen et al. (*Antonie van Leeuwenhoek* 62 (1992), 79-93), Fleer (*Current Opinion in Biotechnology* 3 (1992), 486-496), Vedvick (*Current Opinion in Biotechnology* 2 (1991), 742-745) y Buckholz (*Bio/Technology* 9 (1991), 1067-1072).

Los vectores de expresión han sido descritos ampliamente en la literatura. Como regla, estos contienen no solamente un gen marcador de selección y un origen de replicación que asegura la replicación en el hospedero seleccionado, sino también un promotor bacteriano o viral, y en la mayoría de los casos una señal de terminación para transcripción. Entre el promotor y la señal de terminación hay en general por lo menos un sitio de restricción o un

48
47

polienlazador el cual permite la inserción de una secuencia de ADN codificadora. La secuencia de ADN que controla de manera natural la transcripción del gen correspondiente se puede utilizar como la secuencia de promotor, si ésta es activa en el organismo hospedero

5 seleccionado. Sin embargo, esta secuencia también se puede intercambiar por otras secuencias de promotor. Es posible utilizar promotores que aseguren la expresión constitutiva del gen y promotores inducibles que permiten un control deliberado de la expresión del gen. Las secuencias de promotor bacterianas y virales

10 que poseen estas propiedades son descritas en detalle en la literatura. Las secuencias reguladoras para la expresión en microorganismos (por ejemplo *E. coli*, *S. cerevisiae*) son descritas en forma suficiente en la literatura. Los promotores que permiten una expresión particularmente alta de una secuencia corriente abajo son

15 por ejemplo el promotor T7 (Studier et al., *Methods in Enzymology* 85 (1990), 60-89), *lacUV5*, *trp*, *trp-lacUV5* (DeBoer et al., en Rodriguez y Chamberlin (Eds), *Promoters, Structure and Function*: Praeger, New York, (1982), 462-481; DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), 21-25), *lp1*, *rac* (Boros et al., *Gene* 42 (1986), 97-100). Los

20 promotores inducibles se utilizan de preferencia para la síntesis de polipéptidos. Estos promotores con frecuencia llevan a rendimientos de polipéptido más altos que los promotores constitutivos. Con el fin de obtener una cantidad óptima de polipéptido, con frecuencia se utiliza un procedimiento de dos etapas. Primero, las células

25 hospederas se cultivan bajo condiciones óptimas hasta una densidad

celular relativamente alta. En el segundo paso, se induce la transcripción dependiendo del tipo de promotor utilizado. En este sentido, un promotor tac es particularmente apropiado el cual puede ser inducido por lactosa o IPTG (=isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) 5 (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 21-25). Las señales de terminación para la transcripción también se describen en la literatura.

La transformación de la célula hospedera con un polinucleótido o vector de conformidad con la invención se puede 10 llevar a cabo utilizando métodos estándar, como por ejemplo los descritos en Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU.; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. La célula hospedera se cultiva en 15 medio nutritivo que satisfaga los requerimientos de la célula hospedera particular utilizada, en particular con respecto al valor de pH, temperatura, concentración de sal, aireación, antibióticos, vitaminas, elementos traza, etc.

En otro aspecto de la presente invención, el 20 microorganismo recombinante también se caracteriza porque es capaz de convertir acetil-CoA en acetona. Los métodos para proveer dicho microorganismo recombinante se describen por ejemplo en el documento EP 2 295 593. El término "que es capaz de convertir acetil-CoA en acetona" en el contexto de la presente invención 25 significa que el organismo/microorganismo tiene la capacidad de

5/19

producir acetona dentro de la célula debido a la presencia de enzimas que proveen actividades enzimáticas que permiten la producción de acetona a partir de acetil-CoA.

La acetona es producida por ciertos microorganismos, tales como *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium cellulolyticum*, *Bacillus polymyxa* y *Pseudomonas putida*. La síntesis de acetona está caracterizada de manera más adecuada en *Clostridium acetobutylicum*. Esta empieza con una reacción (paso de reacción 1) en la cual dos moléculas de acetil-CoA se condensan como acetoacetil-CoA. Esta reacción es catalizada por acetil-CoA acetiltransferasa (EC 2.3.1.9). La acetoacetil-CoA después se convierte en acetoacetato por una reacción con ácido acético o ácido butírico que da como resultado también la producción de acetil-CoA o butiril-CoA (paso de reacción 2). Esta reacción es catalizada por ejemplo por acetoacetilCoA transferasa (EC 2.8.3.8). La acetoacetilCoA transferasa es conocida a partir de varios organismos, por ejemplo a partir de *E. coli* en la cual ésta es codificada por el gen *atoAD* o a partir de *Clostridium acetobutylicum* en el cual ésta es codificada por el gen *ctfAB*. Sin embargo, también otras enzimas pueden catalizar esta reacción, por ejemplo 3-oxoácido CoA transferasa (EC 2.8.3.5) o succinato CoA ligasa (EC 6.2.1.5).

Por último, el acetoacetato es convertido en acetona mediante un paso de descarboxilación (paso de reacción 3) catalizado por la acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4).

Los pasos de reacción 1 y 2 antes descritos y las enzimas

que los catalizan no son característicos para la síntesis de acetona y se pueden encontrar en varios organismos. En contraste, el paso de reacción 3 el cual es catalizado por la acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4) se encuentra solamente en aquellos organismos que son

5 capaces de producir acetona.

En una modalidad preferida el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo, el cual de manera natural tiene la capacidad de producir acetona. Por lo tanto, de preferencia el microorganismo pertenece al género

10 Clostridium, Bacillus o Pseudomonas, de manera más preferida a la especie Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Clostridium cellulolyticum, Bacillus polymyxa o Pseudomonas putida.

En otra modalidad preferida, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo,

15 obtenido a partir de un organismo/microorganismo el cual de manera natural no produce acetona pero que ha sido modificado genéticamente para que produzca acetona, es decir introduciendo el gen o genes necesarios para permitir la producción de acetona en el microorganismo. En principio cualquier microorganismo puede ser

20 modificado genéticamente de esta manera. Las enzimas responsables para la síntesis de acetona han sido descritas anteriormente. Los genes que codifican para las enzimas correspondientes son conocidos en la técnica y se pueden utilizar para modificar genéticamente un microorganismo dado para que produzca acetona.

25 Como se describió anteriormente, los pasos de reacción 1 y 2 de la

51

síntesis de acetona ocurren de manera natural en la mayoría de los organismos. Sin embargo, el paso de reacción 3 es característico y crucial para la síntesis de acetona. Por lo tanto, en una modalidad preferida, se modifica un organismo genéticamente modificado

5 obtenido a partir de un microorganismo que de manera natural no produce acetona para que contenga una secuencia de nucleótido que codifica para una enzima que cataliza la conversión de acetoacetato en acetona mediante descarboxilación, por ejemplo una acetoacetato

10 descarboxilasa (EC 4.1.1.4). Las secuencias de nucleótido provenientes de diversos organismos que codifican para esta enzima son conocidas en la técnica, por ejemplo el gen *adc* proveniente de *Clostridium acetobutylicum* (números de acceso Uniprot P23670 y P23673), *Clostridium beijerinckii* (*Clostridium* MP; Q9RPK1), *Clostridium pasteurianum* (número de acceso Uniprot P81336),

15 *Bradyrhizobium* sp. (cepa BTai1/ATCC BAA-1182; número de acceso Uniprot A5EBU7), *Burkholderia mallei* (ATCC 10399 A9LBS0), *Burkholderia mallei* (número de acceso Uniprot A3MAE3), *Burkholderia mallei* FMH A5XJB2, *Burkholderia cenocepacia* (número de acceso Uniprot A0B471), *Burkholderia ambifaria* (número de

20 acceso Uniprot Q0b5P1), *Burkholderia phytofirmans* (número de acceso Uniprot B2T319), *Burkholderia spec.* (número de acceso Uniprot Q38ZU0), *Clostridium botulinum* (número de acceso Uniprot B2TLN8), *Ralstonia pickettii* (número de acceso Uniprot B2UIG7), *Streptomyces nogalater* (número de acceso Uniprot Q9EYI7),

25 *Streptomyces avermitilis* (número de acceso Uniprot Q82NF4),

52
83

Legionella pneumophila (número de acceso Uniprot Q5ZXQ9),
Lactobacillus salivarius (número de acceso Uniprot Q1WVG5),
Rhodococcus spec. (número de acceso Uniprot Q0S7W4),
Lactobacillus plantarum (número de acceso Uniprot Q890G0),
5 Rhizobium leguminosarum (número de acceso Uniprot Q1M911),
Lactobacillus casei (número de acceso Uniprot Q03B66), Francisella
tularensis (número de acceso Uniprot Q0BLC9), Saccharopolyspora
erythrae (número de acceso Uniprot A4FKR9). Korarchaeum
cryptofilum (número de acceso Uniprot B1L3N6), Bacillus
10 amyloliquefaciens (número de acceso Uniprot A7Z8K8), Cochliobolus
heterostrophus (número de acceso Uniprot Q8NJK3), Sulfolobus
islandicus (número de acceso Uniprot C3ML22) y Francisella
tularensis subsp. holarctica (cepa OSU18).

De manera más preferida, el microorganismo está
15 modificado genéticamente para que sea transformado con una
molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede
catalizar el paso de reacción 2 de la síntesis de acetona mencionado
anteriormente, es decir la conversión de acetoacetil-CoA en
acetoacetato.

20 Incluso de manera más preferida, el microorganismo está
genéticamente modificado para que sea transformado con una
molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede
catalizar el paso de reacción 1 de la síntesis de acetona mencionado
anteriormente, es decir la condensación de dos moléculas de acetil-
25 CoA en acetoacetatil-CoA.

En una modalidad particularmente preferida el microorganismo está genéticamente modificado para que sea transformado con una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede catalizar el paso de reacción 1 de la síntesis de acetona mencionado anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede catalizar el paso de reacción 2 de la síntesis de acetona mencionado anteriormente o con una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede catalizar el paso de reacción 1 de la síntesis de acetona mencionado anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede catalizar el paso de reacción 3 antes mencionado de la síntesis de acetona o con una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede catalizar el paso de reacción 2 de la síntesis de acetona mencionado anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede catalizar el paso de reacción 3 antes mencionado de la síntesis de acetona o con una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede catalizar el paso de reacción 1 de la síntesis de acetona mencionado anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede catalizar el paso de reacción 2 de la síntesis de acetona mencionado anteriormente y con una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima que puede catalizar el paso de reacción 3 antes mencionado de la síntesis de acetona.

Los métodos para preparar los microorganismos

SA
65

genéticamente modificados antes mencionados son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, en términos generales, el microorganismo se transforma con una construcción de ADN que permite la expresión de la enzima respectiva en el microorganismo. Dicha construcción

5 normalmente comprende la secuencia codificadora en cuestión ligada a secuencias reguladoras que permiten la transcripción y traducción en la célula hospedera respectiva, por ejemplo un promotor y/incrementador y/o terminador de transcripción y/o sitios de unión a ribosoma, etc. La técnica antecedente ya describe microorganismos

10 que han sido genéticamente modificados para que sean capaces de producir acetona. En particular los genes provenientes de, por ejemplo, *Clostridium acetobutylicum* han sido introducidos en *E. coli* con lo cual se permite la síntesis de acetona en *E. coli*, una bacteria que no produce acetona de manera natural (Bermejo et al., Appl.

15 Environ. Microbiol. 64 (1998); 1079-1085; Hanai et al., Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007), 7814-7818). En particular Hanai et al. (loc. cit.) muestran que es suficiente introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica para una acetoacetato descarboxilasa (tal como la que proviene de *Clostridium acetobutylicum*) con el fin de lograr la

20 producción de acetona en *E. coli* lo que indica que las enzimas endógenas en *E. coli* catalizan los pasos de reacción 1 y 2 antes mencionados (es decir los productos de expresión de los genes *atoB* y *atoAD* de *E. coli*) son suficientes para proveer sustrato para la producción de acetona.

25 En otro aspecto de la presente invención, el

465

microorganismo recombinante también se caracteriza porque es capaz de convertir acetil-CoA en acetona y convertir acetona en isobuteno. Los métodos para proveer dicho microorganismo recombinante se describen por ejemplo en los documentos EP-A 2 295 593 (EP 09 17 0312), WO 2010/001078 y EP 10 18 8001.

En otro aspecto de la presente invención, el microorganismo recombinante se caracteriza porque es capaz de convertir acetil-CoA en acetona y convertir acetona en propeno. Los métodos para proveer dicho microorganismo recombinante se describen por ejemplo en Hanai et al., Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007), 7814-7818.

Un experto en la técnica reconocerá que las modificaciones genéticas adicionales a los microorganismos de la presente invención podrían llevar a mejoras en la eficacia mediante las cuales los microorganismos de la presente invención convierten el material de abastecimiento en producto. Por ejemplo, los microorganismos naturales comúnmente producen productos tales como formiato, acetato, lactato, succinato, etanol, glicerol, 2,3-butanodiol, metilglioxal e hidrógeno; de los cuales todos podrían ser perjudiciales para la producción de, por ejemplo, acetona, isobuteno o propeno a partir de azúcares. La eliminación o reducción sustancial de dichos subproductos no deseados se puede lograr mediante eliminación o reducción de las actividades de enzimas clave que llevan a su producción. Dichas actividades incluyen, pero no se limitan a, el grupo que consiste de:

- *acetil-CoA + formiato = CoA + piruvato* (por ejemplo, catalizado por la formiato C-acetiltransferasa, también conocida como piruvato formiato-liasa (EC 2.3.1.54); para *E. coli*- *pflB*, ID de Gen de NCBI: 945514);

5 - *ATP + acetato = ADP + fosfato de acetilo* (por ejemplo, catalizada por acetato cinasa (EC 2.7.2.1); para *E. coli*- *ackA*, ID de Gen de NCBI: 946775);

 - *(R)-lactato + NAD⁺ = piruvato + NADH + H⁺* (por ejemplo, catalizada por L-lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.28); para *E. coli*
10 *ldhA*, ID de Gen de NCBI: 946315);

 - *fosfato + oxaloacetato = fosfoenolpiruvato + HCO₃⁻* (por ejemplo, catalizada por fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31); para *E. coli* *ppc*, ID de Gen de NCBI: 948457);

 - *ATP + oxaloacetato = ADP + fosfoenolpiruvato + CO₂*
15 (por ejemplo, catalizada por fosfoenolpiruvato carboxicinas (ATP) (EC 4.1.1.49); para *E. coli* *pck*, ID de Gen de NCBI: 945667);

 - *succinato + aceptor = fumarato + aceptor reducido* (por ejemplo, catalizada por succinato deshidrogenasa (EC 1.3.99.1); para *E. coli* que comprende *frdA* y *frdB*, ID de Gen de NCBI: 948667 y
20 948666, respectivamente);

 - *un 2-oxo carboxilato* (por ejemplo *piruvato*) = *un aldehído* (por ejemplo *acetaldehído* + CO₂ (por ejemplo, catalizada por piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1));

 - *acetaldehído + CoA + NAD⁺ = acetil-CoA + NADH + H⁺*
25 (por ejemplo, catalizada por acetaldehído deshidrogenasa

(acetiladora) (EC 1.2.1.10); para *E. coli* *adhE*, ID de Gen de NCBI: 945837);

- *sn-glicerol 3-fosfato* + $NAD(P)^+$ = *glicerona fosfato* + $NAD(P)H + H^+$ (por ejemplo, catalizada por glicerol-3-fosfato
5 deshidrogenasa [NAD(P)+] (EC 1.1.1.94); para *E. coli* *gpsA*, ID de Gen de NCBI: 948125);

- 2 *piruvato* = 2-*acetolactato* + CO_2 (por ejemplo, catalizada por acetolactato sintetasa (EC 2.2.1.6); para *E. coli* *ilvH* e *ilvI*, ID de Gen de NCBI: 947267 y 948793, respectivamente);

10 - *glicerona fosfato* = *metilglioxal* + *fosfato* (por ejemplo, catalizada por metilglioxal sintetasa (EC 4.2.3.3); para *E. coli* *mgsA*, ID de Gen de NCBI: 945574); y

- *formiato* + H^+ = $CO_2 + H_2$ (por ejemplo, catalizada por formiato hidrogenoliasa (EC 1.2.1.2 junto con EC 1.12.1.2); para *E.*
15 *coli* *fdhF* (EC 1.2.1.2), ID de Gen de NCBI: 948584).

Por lo tanto, en una modalidad preferida, el microorganismo de conformidad con la invención se caracteriza porque se eliminan o se reducen una o más de las actividades de
20 enzima listadas anteriormente.

Un experto en la técnica reconocerá también que las modificaciones genéticas a los elementos reguladores en los microorganismos de la presente invención podrían llevar a mejoras en la eficacia con las cuales los microorganismos de la presente
25 invención convierten el material de abastecimiento en producto.

Dentro de *E. coli*, dichas modificaciones genéticas incluyen, pero no se limitan a, el grupo que consiste de:

- eliminar el gen *fnr* (ID de Gen de NCBI: 945908), un regulador global de crecimiento anaeróbico; y
- 5 - eliminar el gen *rpoS* (ID de Gen de NCBI: 947210), una ARN polimerasa, factor sigma S (sigma 38).

Por lo tanto, en otra modalidad preferida el microorganismo de conformidad con la invención muestra por lo menos una de estas deleciones.

10 Un aspecto adicional de la presente invención es el uso del microorganismo recombinante de la presente invención para la conversión de glucosa en acetil-CoA. La acetil-CoA (también conocida como acetil-Coenzima A) en la estructura química es el tioéster entre la coenzima A (un tiol) y ácido acético y es una

15 molécula precursora importante para la producción de metabolitos útiles. La acetil-CoA después puede ser convertida adicionalmente por el microorganismo recombinante en metabolitos útiles tales como ácido L-glutámico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, succinato y polihidroxibutirato.

20 Otro aspecto de la presente invención es el uso del microorganismo recombinante de la presente invención que es capaz de convertir acetil-CoA en acetona para la conversión de glucosa en acetona.

25 Un aspecto adicional de la presente invención es el uso del microorganismo recombinante de la presente invención que es

59

capaz de convertir acetil-CoA en acetona y acetona en isobuteno para la conversión de glucosa en isobuteno.

De nuevo un aspecto adicional de la presente invención es el uso del microorganismo recombinante de la presente invención
5 que es capaz de convertir acetil-CoA en acetona y acetona en propeno para la conversión de glucosa en propeno.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método para la producción de acetona y/o isobuteno y/o propeno a partir de glucosa en el cual el microorganismo recombinante antes
10 mencionado se cultiva bajo condiciones que permitan la producción de acetona y/o isobuteno y/o propeno y en el cual se aíslan la acetona y/o isobuteno y/o propeno. Los microorganismos se cultivan bajo condiciones de cultivo apropiadas que permitan que ocurran las reacciones enzimáticas. Las condiciones de cultivo específicas
15 dependen del microorganismo específico empleado pero son bien conocidas por el experto en la técnica. Las condiciones de cultivo generalmente se eligen de tal manera que éstas permitan la expresión de los genes que codifican para las enzimas para las reacciones respectivas. El experto en la técnica conoce varios
20 métodos para mejorar y afinar la expresión de ciertos genes en ciertas etapas del cultivo tal como la inducción de la expresión de genes mediante inductores químicos o mediante un cambio de temperatura.

En otra modalidad preferida el método de conformidad
25 con la invención comprende también el paso de recolectar los

productos gaseosos, en particular isobuteno o propeno, mediante desgasificación de la reacción, es decir recuperar los productos que desgasifican, por ejemplo, fuera del cultivo. Por lo tanto en una modalidad preferida, el método se efectúa en presencia de un
5 sistema para recolectar isobuteno o propeno bajo forma graseosa durante la reacción.

De hecho, los alquenos cortos tales como isobuteno y propeno adoptan el estado gaseoso a temperatura ambiente y presión atmosférica. El método de conformidad con la invención por lo tanto
10 no requiere la extracción del producto a partir del medio de cultivo líquido, un paso que siempre es muy costoso cuando se efectúa a escala industrial. La evacuación y almacenamiento de los hidrocarburos gaseosos y su posible separación física subsiguiente y conversión química se pueden efectuar de conformidad con cualquier
15 método conocido por el experto en la técnica.

La presente invención se describe adicionalmente mediante referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitativos.

La Figura 1 muestra dos esquemas para la producción de acetil-CoA a partir de glucosa-6-fosfato a través de la ruta de
20 fosfocetolasa utilizando cualquiera o ambas actividades de fosfocetolasa EC 4.1.2.9 y EC 4.1.2.22.

EJEMPLOS

Métodos generales y materiales

Los procedimientos para las ligaciones y transformaciones son bien conocidos en la técnica. Las técnicas apropiadas para uso en los siguientes ejemplos se pueden encontrar en Sambrook J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, y Sambrook J., supra.

Los materiales y métodos apropiados para el mantenimiento y crecimiento de los cultivos bacterianos son bien conocidos en la técnica. Las técnicas apropiadas para uso en los siguientes ejemplos se pueden encontrar en la referencia Manual of Methods for General Bacteriology (Philipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W, Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Philips, eds).

Todos los reactivos y materiales utilizados para el crecimiento y mantenimiento de las células bacterianas se obtienen a partir de Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO) a menos que se especifique de otra manera.

TABLA 1

Plásmidos utilizados y construidos

Nombre del Plásmido	Descripción
pKD46	Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645

62
85

TABLA 1 (cont.)

	Nombre del Plásmido	Descripción
	pCP20	Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645
5	pGBE0687	El plásmido pGBE0687 presenta un gen de resistencia a apramicina colocado bajo el control de su propio promotor
	pGBE0688	El plásmido pGBE0688 presenta un gen de resistencia a espectinomicina colocado bajo el control de su propio promotor
	pGBE0421	Plásmido de GeneArt® (Invitrogen) que codifica para fosfocetolasa de <i>L. lactis</i>
	pGBE0123	Una versión modificada del plásmido pUC18 (New England Biolabs) el cual contiene un Sitio de Clonación Múltiple (MCS) modificado.
10	pGBE0457	Plásmido que permite la expresión de la fosfocetolasa de <i>L. lactis</i>
	pGBE0686	Fagémidos pBluescript II, Agilent Technologies
	pGBE0690	Genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonados en pGBE0689
	pGBE0691	Gen <i>adc</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonado en pGBE0690
15	pGBE0051	pUC19, New England Biolabs
	pGBE0692	Genes <i>ctfA</i> , <i>ctfB</i> y <i>adc</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonados en pGBE0051
	pGBE0693	Gen <i>thl</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonado en pGBE0692
20	pGBE0124	Una versión modificada del plásmido pSU18 (Borja Bartolomé, Yolanda Jubete, Eduardo Martínez and Fernando de la Cruz, Gene, 1991, Vol. 102, Fascículo 1, pp. 75-78)
	pGBE0096	Genes <i>thl</i> , <i>ctfA</i> , <i>ctfB</i> y <i>adc</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> clonados en pGBE0124
	pGBE0928	Plásmido que permite la expresión de la fosfocetolasa de <i>L. lactis</i>
	pGBE1020	Plásmido que permite la expresión de la fosfocetolasa de <i>L. lactis</i> y la producción de acetona
25	pGBE1021	Plásmido que permite la producción de acetona

63

TABLA 2
Cepas utilizadas y construidas

FRT : objetivo de reconocimiento de FLP

5	Nombre de cepa	Genotipo	Cepa de origen de la construcción	
	GBE0219	F-lambda-ilvG-rfb-50 rph-1		<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 de tipo silvestre
	GBE0170	pKD46	GBE0129	Transformación de la cepa GBE0129 con el plásmido pKD46
	GBE0329	pGBE0096	GBE0129	Transformación de la cepa GBE0129 con el plásmido pGBE0096
10	GBE0901	Δ ptsHI::FRT	GBE0129	
	GBE0902	Δ ptsHI::FRT pKD46	GBE0901	Transformación de la cepa GBE0901 con el plásmido pKD46
	GBE0903	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad ⁺	GBE0902	
	GBE0929	Δ ptsHI::FRT	GBE0901	Selección de la cepa GBE0901 en medio MS con glucosa como la fuente de carbono.
15	GBE1000	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad ⁺	GBE0903	Selección de la cepa GBE0903 en medio MS con glucosa como la fuente de carbono.
	GBE1001	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad ⁺ pKD46	GBE1000	Transformación de la cepa GBE1000 con el plásmido pKD46
	GBE1005_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad ⁺ Δ pfkA::aac ⁺	GBE1001	
	GBE1005	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad ⁺ Δ pfkA::aac ⁺	GBE1005_pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.
20	GBE1005_p	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad ⁺ Δ pfkA::aac ⁺ pCP20	GBE1005	Transformación de la cepa GBE1005 con el plásmido pCP20
	GBE1006	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT	GBE1005_p	Se confirma la pérdida del plásmido pCP20.
	GBE1010	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT pKD46	GBE1006	Transformación de la cepa GBE1006 con el plásmido pKD46
	GBE1014_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad ⁺	GBE1010	
25	GBE1014	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad ⁺	GBE1014_pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.

65 64

TABLA 2 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre de cepa	Genotipo	Cepa de origen de la construcción	
GBE1283	Δ ptsHI::FRT	GBE0929	Cultivos sucesivos de la GBE0929 en medio MS con glucosa como la fuente de carbono.
GBE1284	Δ ptsHI::FRT pKD46	GBE1283	Transformación de la cepa GBE1283 con el plásmido pKD46
GBE1287	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad ⁺	GBE1284	
GBE1337	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::aad ⁺ pKD46	GBE1287	Transformación de la cepa GBE1287 con el plásmido pKD46
GBE1339	Δ zwf_edd_eda::aac ⁺	GBE0170	
GBE1340	Δ zwf_edd_eda::aac ⁺ pKD46	GBE1339	Transformación de la cepa GBE1339 con el plásmido pKD46
GBE1341_pKD46	Δ zwf_edd_eda::aac ⁺ Δ pfkA::aad ⁺	GBE1340	
GBE1341	Δ zwf_edd_eda::aac ⁺ Δ pfkA::aad ⁺	GBE1341_pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1341_p	Δ zwf_edd_eda::aac ⁺ Δ pfkA::aad ⁺ pCP20	GBE1341	Transformación de la cepa GBE1341 con el plásmido pCP20
GBE1342	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT	GBE1341_p	Se confirma la pérdida del plásmido pCP20.
GBE1343	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT pKD46	GBE1342	Transformación de la cepa GBE1342 con el plásmido pKD46
GBE1344_pKD46	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad ⁺	GBE1343	
GBE1344	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad ⁺	GBE1344_pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1345	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad ⁺ pGBE457 pGBE0096	GBE1344	Transformación de la cepa GBE1344 con ambos plásmidos pGBE96 y pGBE457
GBE1346	pGBE0096	GBE0329	Adaptación de la cepa GBE0329 al medio MS + glucosa (2g/l) + cloranfenicol (25ug/ml)
GBE1347	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad ⁺ pGBE457 pGBE96	GBE1345	Adaptación de la cepa GBE1345 al medio MS + glucosa (2g/l) + cloranfenicol (25ug/ml)

65

TABLA 2 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre de cepa	Genotipo	Cepa de origen de la construcción	
GBE1348	ΔptsHI::FRT pGBE96	GBE0929	Transformación de la cepa GBE0929 con ambos plásmidos pGBE96 y pGBE457
GBE1349	ΔptsHI::FRT Δzwf_edd_eda::FRT ΔpfkA::FRT ΔpfkB::aad+ pGBE457 pGBE0096	GBE1014	Transformación de la cepa GBE1014 con ambos plásmidos pGBE96 y pGBE457
GBE1350	ΔptsHI::FRT pGBE96	GBE1348	Adaptación de la cepa GBE1348 al medio MS + glucosa (2g/l) + cloranfenicol (25ug/ml)
GBE1351	ΔptsHI::FRT Δzwf_edd_eda::FRT ΔpfkA::FRT ΔpfkB::aad+ pGBE457 pGBE0096	GBE1349	Adaptación de la cepa GBE1349 al medio MS + glucosa (2g/l) + cloranfenicol (25ug/ml)
GBE1353_pKD46	ΔptsHI::FRT Δzwf_edd_eda::aad+ ΔpfkA::aac+	GBE1337	
GBE1353	ΔptsHI::FRT Δzwf_edd_eda::aad+ ΔpfkA::aac+	GBE1353_pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1353_P	ΔptsHI::FRT Δzwf_edd_eda::aad+ ΔpfkA::aac+ pCP20	GBE1353	Transformación de la cepa GBE1353 con el plásmido pCP20
GBE1368	ΔptsHI::FRT Δzwf_edd_eda::FRT ΔpfkA::FRT	GBE1353_P	Se confirma la pérdida del plásmido pCP20.
GBE1371	ΔptsHI::FRT Δzwf_edd_eda::FRT ΔpfkA::FRT pKD46	GBE1368	Transformación de la cepa GBE1368 con el plásmido pKD46
GBE1420_pKD46	ΔptsHI::FRT Δzwf_edd_eda::FRT ΔpfkA::FRT ΔpfkB::aad+	GBE1371	
GBE1420	ΔptsHI::FRT Δzwf_edd_eda::FRT ΔpfkA::FRT ΔpfkB::aad+	GBE1420_pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1433	ΔptsHI::FRT Δzwf::aad+	GBE1284	
GBE1436	ΔptsHI::FRT Δzwf::aad+ pKD46	GBE1433	Transformación de la cepa GBE1433 con el plásmido pKD46
GBE1441_pKD46	ΔptsHI::FRT Δzwf::aad+ ΔpfkA::aac+	GBE1436	
GBE1441	ΔptsHI::FRT Δzwf::aad+ ΔpfkA::aac+	GBE1441_pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.
GBE1441_P	ΔptsHI::FRT Δzwf::aad+ ΔpfkA::aac+ pCP20	GBE1441	Transformación de la cepa GBE1441 con el plásmido pCP20

66
6x

TABLA 2 (cont.)

	Nombre de cepa	Genotipo	Cepa de origen de la construcción	
5	GBE1448	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT	GBE1441 _p	Se confirma la pérdida del plásmido pCP20.
	GBE1449	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT pKD46	GBE1448	Transformación de la cepa GBE1448 con el plásmido pKD46
	GBE1518_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB:: aad+	GBE1449	
	GBE1518	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB:: aad+	GBE1518 _pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.
10	GBE2252_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+	GBE1284	
	GBE2252	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+	GBE2252 _pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.
	GBE2253	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ pKD46	GBE2252	Transformación de la cepa GBE2252 con el plásmido pKD46
	GBE2256_pKD46	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ Δ pfkB::aac+	GBE2253	
15	GBE2256	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ Δ pfkB::aac+	GBE2256 _pKD46	Se confirma la pérdida del plásmido pKD46.
	GBE2262	F-lambda-ilvG-rfb-50 rph-1 pGB1021	GBE0129	Transformación de la cepa GBE0129 con plásmido pGB1021
	GBE2263	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE1344	Transformación de la cepa GBE1344 con plásmido pGB1020
	GBE2264	F-lambda-ilvG-rfb-50 rph-1 pGB1021	GBE2262	Adaptación de la cepa GBE2262 al medio MS + glucosa (2g/l) + ampicilina (100ug/ml).
20	GBE2265	Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE2263	Adaptación de la cepa GBE2263 al medio MS + glucosa (2g/l) + ampicilina (100ug/ml).
	GBE2266	Δ ptsHI::FRT pGB1021	GBE1283	Transformación de la cepa GBE1283 con plásmido pGB1021
	GBE2267	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE1420	Transformación de la cepa GBE1420 con plásmido pGB1020
	GBE2268	Δ ptsHI::FRT pGB1021	GBE2266	Adaptación de la cepa GBE2266 al medio MS + glucosa (2g/l) + ampicilina (100ug/ml).

63

TABLA 2 (cont.)

5

10

Nombre de cepa	Genotipo	Cepa de origen de la construcción	
GBE2269	Δ ptsHI::FRT Δ zwf_edd_eda::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE2267	Adaptación de la cepa GBE2267 al medio MS + glucosa (2g/l) + ampicilina (100ug/ml).
GBE2270	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ Δ pfkB::aac+ pGB1020	GBE2256	Transformación de la cepa GBE2256 con plásmido pGB1020
GBE2271	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE1518	Transformación de la cepa GBE1518 con plásmido pGB1020
GBE2272	Δ ptsHI::FRT Δ pfkA::aad+ Δ pfkB::aac+ pGB1020	GBE2270	Adaptación de la cepa GBE2270 al medio MS + glucosa (2g/l) + ampicilina (100ug/ml).
GBE2273	Δ ptsHI::FRT Δ zwf::FRT Δ pfkA::FRT Δ pfkB::aad+ pGB1020	GBE2271	Adaptación de la cepa GBE2266 al medio MS + glucosa (2g/l) + ampicilina (100ug/ml).

TABLA 3

Secuencias de regiones cromosómicas bacterianas, genes

15

utilizados, regiones de plásmidos

20

Nombre	Secuencia de nucleótido	Descripción	SEQ ID NO
secuencia de nucleótido proveniente de la cepa GBE0901, desde los pares de base 2531736 hasta 2531870	Aggctagactttagttccacaacactaaacctataagttggggaaat acagtgtaggctggagctgcttcgaagttcctatactttctagagaata ggaacttcggaataggaactaaggaggatattcatatg	La región FRT está subrayada	SQ 0001

25

68

TABLA 3 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre	Secuencia de nucleótido	Descripción	SEQ ID NO
Cassette de resistencia a espectinomicina	agagcggccgcccacgcgggaagttcctatactttctagagaatag gaacttcagctgatagaaacagaagccactggagcacctcaaaa acaccatcatacactaaatcagtaagttggcagcatcacccgacgc actttgcgcgaataaatacctgtgacggaagatcacttcgcagaat aaataaatcctggtgtccctgttgataccgggaagccctgggccaac ttttggcgaataatgagacgttgatcggcacgtaagaggttccaacttt caccataatgaaataagatcactaccgggcggtatttttgagttatcga gattttcaggagctaaggaagctacatatgagtgaataagtgcccg ccgagatttcggtgcaactatcacaagcactcaacgtcatcgggcg ccacttggagtcgacgttgctggccgtgcatttgtacggctccgcact ggatggcggattgaaaccgtacagtgatattgattgtggtgactgt agctgcaccgctcaatgatgccgtgcggcaagccctgctcgtcgat ctcttgagggttcagcttcccctggccaaaacaaggcactccgcgc cttgaagtgaccatcgtcgtgcacagtgacatcgtaccttggcgta tccggccaggcgggaactgcagttcggagagtggcagcgcaag acatccttgcgggcatcttcgagcccgcacaaaccgattctgacttg gcgattctgtaacaaaggcaaagcaacatagcgtcgtcttggcag gttcagcagcgaaggatctcttcagctcagtcacagaaagcgatcta ttcaaggcactggccgatactctgaagctatggaactcgccgccag attgggcgggcgatgagcgggaatgtagtcttactttgtctcgtatctg gtacaccgcagcaaccggcaagatcgcgccaaaggatgttgctgc cacttgggcaatggcagcgttgccagctcaacatcagcccacctgt tgaatgccaaagcgggcttcttgggcaagaagaagattattgccc gctcgtgcggatcaggtggcggcgctcattaaattcgtgaagtatga agcagttaaactgcttgggtgccagccaataagaaagttcctatactttct agagaataggaacttcgcatgcacgcagcatatgc	Las regiones FRT están subrayadas	SQ 0002
Cassette de resistencia a apramicina	agagcggccgcccacgcgggaagttcctatactttctagagaatag gaacttcgggttcattgtgcagctccatcagcaaaaggggatgataa gtttatcaccaccgactatttgaacagtgccgttgatcgtgctatgatc gactgatgtcatcagcgggtgagtgcaatgtcgtgcaatacgaatgg cgaaaagccgagctcatcggtcagcttctcaaccttggggttacccc cggcggtgtgctgctggtccacagctccttcgtagcgtccggccct cgaagatgggccacttggactgatcgaggccctgcgtgctgcgtg ggtccgggagggacgctcgtcatgccctcgtggtcaggtctggacg acgagccgttcgatcctgccagtcgcccgttacaccggaccttga gttgctctgacacattctggcgctgccaatgtaaagcgagcgc ccatccatttgcctttgcggcagcggggccacaggcagagcagatc atctctgatccattgcccctgccacctcactcgccctgcaagcccgtc gcccgtgtccatgaactcgatgggcaggtacttctcctcggcggtggg acacgatgccaaacacgacgctgcatcttgcgagttgatggcaag	Las regiones FRT están subrayadas	SQ 0003

69

TABLA 3 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre	Secuencia de nucleótido	Descripción	SEQ ID NO
Cassette de resistencia a apramicina	gttcctatggggtgccgagacactgcaccattcttcaggatggcaa gttggtacgcgtcgattatctcgagaatgaccactgctgtgagcgcttt gccttggcggacaggtggctcaaggagaagagccttcagaagga aggtccagtcggtcatgcctttgctcggttgatccgctcccgcgacatt gtggcgacagccctgggtcaactgggcccagatccgttgatcttcct gcatccgccagaggcggtgatgcgaagaatgcgatgccgctcgcc agtcgattggctgagctcatgagcggagaacgagatgacgttga ggggcaaggtcgcgctgattgctggggcaacacgtggagcggatc ggggattgtctttcttcagctcgctgatgatgctgacgctcaatgcc <u>gaagttcctatactttctagagaataggaacttcgcatgcacgcagc</u> atatgc	Las regiones FRT están subrayadas	SQ 0003
MCS del plásmido pGB0123	<u>AAGCTT</u> GCGGCCGCGGGGTTAATTAACCTCCT TAGTTTAAACCTAGGCATGCCTCTAGAGGATC CCCGGGTACCGAGCTCGAAttaCCTGCAG <u>GAAT</u> <u>TC</u>	Los sitios de restricción para <i>HindIII</i> y <i>EcoRI</i> están subrayados.	SQ 0004
Gen de fosfocetolasa optimizado de <i>Lactococcus lactis</i> flanqueado por sitios de restricción de <i>PacI</i> y <i>NotI</i>	<u>TTAATTAAT</u> GCATCATCACCACCATCACATGAC CGAATATAACAGCGAAGCCTATCTGAAAAAACT GGATAAATGGTGGCGTGCAGCAACCTATCTGG GTGCAGGTATGATTTTTCTGAAAGAAAATCCGC TGTTTAGCGTTACCGGCACCCCGATTAAAGCA GAAAATCTGAAAGCCAATCCGATTGGTCATTG GGGCACCGTTAGCGGTGACACCTTTCTGTATG CACATGCAAATCGCCTGATTAACAAATATAACC AGAAAATGTTTTATATGGGTGGTCCGGGTCAT GGTGGTCAGGCAATGGTTGTTCCGAGCTATCT GGATGGTAGCTATACCGAAGCATATCCGGAAA TTACCCAGGATCTGGAAGGTATGAGCCGTCTG TTTAAACGTTTTAGCTTTCCGGGTGGTATTGGT AGCCACATGACCGCACAGACACCGGGTAGCC TGCATGAAGGTGGTGAAGTGGTTATGTTCTG AGCCATGCAACCGGTGCAATTCTGGATCAGCC GGAACAAATTGCATTTGCAGTTGTTGGTGATG GTGAAGCAGAAACCGGTCCGCTGATGACCAG CTGGCATAGCATCAAATTTATCAACCCGAAAAA CGATGGTGCCATTCTGCCGATTCTGGATCTGA ATGGCTTTAAAATCAGCAATCCGACCCTGTTTG	Los sitios de restricción para <i>PacI</i> y <i>NotI</i> están subrayados.	SQ 0005

70

TABLA 3 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre	Secuencia de nucleótido	Descripción	SEQ ID NO
Gen de fosfocetolasa optimizado de <i>Lactococcus lactis</i> flanqueado por sitios de restricción de <i>PacI</i> y <i>NotI</i>	CACGTACCAGTGATGTTGATATCCGCAAATTTT TCGAAGGTCTGGGTTATAGTCCGCGTTATATT GAAAACGATGACATCCATGACTACATGGCCTA TCATAAACTGGCAGCAGAAGTTTTTGACAAAG CCATTGAAGATATCCATCAGATTGAGAAAGATG CCCGTGAAGATAATCGCTATCAGAATGGTGAA ATTCCGGCATGGCCGATTGTTATTGCACGTCT GCCGAAAGGTTGGGGTGGTCCTCGTTATAATG ATTGGAGCGGTCCGAAATTTGATGGTAAAGGT ATGCCGATCGAACATAGCTTTCGTGCACATCA GGTTCGGCTGCCGCTGAGCAGCAAAAACATG GGCACCTGCCGGAATTTGTTAAATGGATGAC CAGCTATCAGCCGGAACCCTGTTTAATGCAG ATGGTAGCCTGAAAGAAGAAGTGCAGGATTTT GCACCGAAAGGTGAAATGCGTATGGCAAGCAA TCCGGTTACCAATGGTGGTGTGATTATAGCA ATCTGGTTCTGCCGATTGGCAAGAATTTGCA AATCCGATTAGCGAAAACAATCGTGGTAAACT GCTGCCGGATACCAATGATAATATGGATATGA ACGTGCTGAGCAAATATTTCCGCCGAAATTGTTA AACTGAACCCGACCCGTTTTCTGTCTGTTTGGT CCGGATGAAACCATGAGCAATCGTTTTTTGGGA GATGTTTAAAGTGACCAATCGTCAGTGGATGC AGGTTATCAAAAATCCGAACGATGAGTTTATTA GTCCGGAAGGTCGCATTATTGATAGCCAGCTG AGCGAACATCAGGCAGAAGGTTGGCTGGAAG GTTATACCCTGACCGGTCGTACCGGTGTTTTT GCAAGCTATGAAAGTTTTCTGCGTGTTGTTGAT AGCATGCTGACCCAGCACTTTAAATGGATTGCG TCAGGCAGCAGATCAGAAATGGCGTCATGATT ATCCGAGCCTGAATGTTATTAGCACCAGCACC GTTTTTTCAGCAGGATCATAATGGTTATACCCAT CAAGATCCGGGTATGCTGACCCATCTGGCAGA GAAAAAAAGCGATTTTATTCGTGAGTATCTGCC TGCAGATGGTAATACCCTGCTGGCCGTTTTTG ATCGTGATTTTCAGGATCGCAGCAAAATTAAC CATATTGTTGCAAGCAAACAGCCTCGTCAGCA GTGGTTTACCAAAGAAGAAGCAGAAAAACTGG CCACCGATGGTATTGCAACCATTGATTGGGCA AGCACCGCAAAGATGGTGAAGCCGTTGATCT	Los sitios de restricción para <i>PacI</i> y <i>NotI</i> están subrayados.	SQ 0005

22
71

TABLA 3 (cont.)

Nombre	Secuencia de nucleótido	Descripción	SEQ ID NO
Gen de fosfoacetolasa optimizado de <i>Lactococcus lactis</i> flanqueado por sitios de restricción de <i>PacI</i> y <i>NotI</i>	GGTTTTTGCAAGTGCCGGTGCAGAACCGACCA TTGAAACCCTGGCAGCACTGCATCTGGTTAAT GAAGTTTTTCCGCAGGCCAAATTTGCTATGTT AATGTTGTTGAACTGGGTCTGCTGCAGAAAAA GAAAGGTGCACTGAATCAAGAACGCGAACTGA GTGATGAAGAGTTCGAAAAATACTTTGGTCCG AGCGGTACACCGGTTATTTTTGGTTTTTCATGGC TATGAAGATCTGATCGAGAGCATCTTTTATCAG CGTGGTCATGATGGTCTGATTGTTTCATGGTTAT CGTGAAGATGGTGATATTACCACCACCTATGA TATGCGTGTTTATAGCGAACTGGATCGTTTTCA TCAGGCAATTGATGCAATGCAGGTTCTGTATG TGAATCGTAAAGTTAATCAGGGTCTGGCCAAA GCATTTATTGATCGTATGGAACGTACCCTGGT GAAACATTTTGAAGTTACCCGTAATGAAGGCG TTGATATTCCGGAATTTACCGAATGGGTTTGGA GCGATCTGAAAAAGTAATGAGCGGCCGC	Los sitios de restricción para <i>PacI</i> y <i>NotI</i> están subrayados.	SQ 0005
MCS del plásmido pGB0124	GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAG AGGCATGCCTAGGTTTAAACTAAGGAGGTAA TTAACCCCGCGGCCGCAAGCTT		SQ 0006

TABLA 4

Secuencia de iniciador

Nombre	Secuencia	Descripción	SEG ID NO
0635	Ggttcaattcttccttagcggc	Iniciador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye los genes <i>ptsHI</i>	RC0001
0638	Ccgcaaaaacgacatccggcacg	Iniciador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye los genes <i>ptsHI</i>	RC0002
0633	caagtataccctggcttaagtaccgggtagttaa cttaaggagaatgacAGAGCGGCCGCC ACCGCGGG	Iniciador para delección de los genes <i>zwf_edd_eda</i>	RC0003

72
75

TABLA 4 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre	Secuencia	Descripción	SEG ID NO
0634	gcaaaaaaacgctacaaaaatgccgatcctc gatcgggcattttgactGCATATGCTGCG TGCATGCG	Iniciador para delección de los genes <i>zwf_edd_eda</i>	Rc0004
1036	Ccgcactttgcgcgcttttccc	Iniciador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye los genes <i>zwf_edd_eda</i>	RC0005
1037	Ggtgattttcagtgaggtctcccc	Iniciador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye los genes <i>zwf_edd_eda</i>	RC0006
0629	agacttccggcaacagatttcattttgattccaa agttcagaggtagtcAGAGCGGCCGCC ACCGCGGG	Iniciador para delección del gen <i>pfkA</i>	RC0007
0630	gcttctgtcatcggttcagggtaaaggaatctgc cttttccgaaatcaGCATATGCTGCGTG CATGCG	Iniciador para delección del gen <i>pfkA</i>	RC0008
0619	Ggcgctcacgatcttcgcacgcggc	Iniciador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen <i>pfkA</i>	RC0009
0620	Cgcctcatattgctgacaaagtgcgc	Iniciador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen <i>pfkA</i>	RC0010
0631	actttcgcgtgattcggtgccagactgaaatcagc ctataggaggaaatgAGAGCGGCCGCC ACCGCGGG	Iniciador para delección del gen <i>pfkB</i>	RC0011
0632	gttgccgacagggttggtgatgattcccccaatgct gggggaatgttttgGCATATGCTGCGT GCATGCG	Iniciador para delección del gen <i>pfkB</i>	RC0012
0621	Ccacagcgaccaggcagtggtgtgtcc	Iniciador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen <i>pfkB</i> .	RC0013

23

TABLA 4 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre	Secuencia	Descripción	SEG ID NO
0622	Gcactttgggtaagccccgaaacc	Iniciador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen <i>pfkB</i> .	RC0014
pUC18_246	Ccattcaggctgcgcaactg	Iniciador para determinar la secuencia del gen de fosfocetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0015
pUC18_3800_rev	Ggcggttgccgattcattaatgc	Iniciador para determinar la secuencia del gen de fosfocetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0016
Pkt_lacto_700_dir	CAATCCGACCCTGTTTGCACGTAC	Iniciador para determinar la secuencia del gen de fosfocetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0017
Pkt_lacto_mil_dir	GCTGCCGGATACCAATGATAATATGG	Iniciador para determinar la secuencia del gen de fosfocetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0018
Pkt_lacto_mil_rev	CCATATTATCATTGGTATCCGGCAGC	Iniciador para determinar la secuencia del gen de fosfocetolasa proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> clonado en el pGB0123.	RC0019
0070	CCCGGGGGATCCAGAATTTAAAGGAGGGATT	Iniciador para amplificar los genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824.	RC0020
0071	CTCGAGGATATCAAGAATTCTTTTAAACAGCCATGGGTC	Iniciador para amplificar los genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i> provenientes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824.	RC0021
1066	TGTAAAACGACGGCCAGT	Iniciador general para determinación de secuencia	RC0022

24
75

TABLA 4 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre	Secuencia	Descripción	SEG ID NO
1067	CAGGAAACAGCTATGACC	Iniciador general para determinación de secuencia	RC0023
0072	CTCGAGGATATCAGGAAGGTGAC TTTTATGTAAAGG	Iniciador para amplificar el gen <i>adc</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824.	RC0024
0073	GCATGCGTCGACATTAAAAAATA AGAGTTACC	Iniciador para amplificar el gen <i>adc</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824.	RC0025
1068	CCTCACGGCAAAGTCTCAAGC	Iniciador para determinar la secuencia de los genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i>	RC0026
1069	GCCATGGGTCTAAGTTCATTGG	Iniciador para determinar la secuencia de los genes <i>ctfA</i> y <i>ctfB</i>	RC0027
0074	CATGATTTTAAGGGGGGTACCAT ATGCATAAGTTTAA	Iniciador para amplificar el gen <i>thl</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824	RC0028
0075	GTTATTTTAAAGGATCCTTTTATAG CACTTTTCTAGC	Iniciador para amplificar el gen <i>thl</i> proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> cepa ATCC 824	RC0029
1070	GGCAGAAAGGGAGAACTGTAG	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0030
1071	TGGAAAGAATACGTGCAGGCGG	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0031
1072	GATTACGCCAAGCTTGCATGCC	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0032



TABLA 4 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre	Secuencia	Descripción	SEG ID NO
1073	CCGGCCTCATCTACAATACTACC	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0033
1074	CCCATTATTGCTGGGTCAACTCC	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0034
1516	CCCGGTACCTCATTACTTTTTCAG	Iniciador para amplificar el gen de fosfocetolasa (YP_003354041.1) proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> .	RC0035
1517	GGGGAATTCAGGAGGTGTACTAG ATGCATCATCACCACCATCACAT GACC	Iniciador para amplificar el gen de fosfocetolasa (YP_003354041.1) proveniente de <i>Lactococcus lactis</i> .	RC0036
1994	CCATAGCTCCACCCATACCAGAG AGC	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0037
1995	GCTATTATTACGTCAGCATCTCCT GC	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0038
1996	GCAGGCGAAGTTAATGGCGTGC	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0039
1997	GATACGGGGTAACAGATAAACCA	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0040

276

TABLA 4 (cont.)

5

10

15

20

25

Nombre	Secuencia	Descripción	SEG ID NO
1998	CCCTTTCTGCCTTTAATTACTACAGG	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0041
1999	GCATCAGGATTAAATGACTGTGCAGC	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0042
2000	GGACTAGCGCCCATTCCTCAACTATTCC	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0043
2001	GCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAAGCC	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0044
2002	GCATTGCGTGTACAAGAGTAACGAG	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0045
2003	CCTGTCCAAGCTTCATGTACGG	Iniciador para determinar la secuencia del operón de acetona proveniente de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC 824)	RC0046
1109	GCGCAAGATCATGTTACCGGTAAATAACCATAAAGGATAAGCGCAGATAGCATATGCTGCGTGCATGCG	Iniciador para delección del gen zwf.	RC0047
1110	CGCCTGTAACCGGAGCTCATAGGG	Iniciador para determinar la secuencia de la región cromosómica de <i>E. coli</i> que incluye el gen zwf.	RC0048

Integración cromosómica para expresiones suprimidas de
gen

Para integrar el ADN en una región específica del cromosoma, se requieren homología del ADN que se inserta al sitio cromosómico elegido como blanco y un marcador seleccionable. Es conveniente que el marcador pueda ser retirado fácilmente después de la integración. El sistema de FRT/Flp recombinasa provee un mecanismo para retirar el marcador. Los sitios FRT son sitios de reconocimiento para las Flp recombinasas. Flp es una recombinasa específica de sitio, la cual corta el ADN intercalado de los sitios de reconocimiento directamente repetidos.

El cassette de integración que contiene los brazos homólogos para el sitio cromosómico elegido como blanco y que codifica para un marcador seleccionable flanqueado por sitios FRT (Datsenko KA. y Wanner BL, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645) se transforma en las células objetivo que alojan a pKD46 (Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645). Los integrantes exitosos se seleccionan cultivando las células en presencia del antibiótico. De manera subsiguiente, pKD46 se cura a partir de las células y el plásmido de recombinasa se introduce después en los integrantes para remoción del gen de antibiótico. Las cepas que contienen un cassette de FRT se transforman con el plásmido pCP20 que codifica para Flp recombinasa (Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the

National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645). Después de la remoción del marcador integrado, los plásmidos de recombinasa se curan a partir de la cepa.

5

EJEMPLO 1

Construcción de la cepa GBE1014

El propósito de esta sección es describir la construcción de una cepa de *Escherichia coli*, nombrada GBE1014, para lo cual la captación de glucosa dependiente de PEP se inactiva mediante
10 deleción de los genes de transporte de PTS, se habilita la captación de glucosa dependiente de ATP, la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) se inactiva mediante deleción de los genes de la fosfofructocinasa, y la ruta de fosfato de pentosa (PPP) se inactiva
15 mediante deleción del gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La construcción comienza con la cepa GBE0901. GBE0901 es una cepa de *Escherichia coli*, (Migula) Castellani y Chalmers, MG1655 (ATCC #700926) en la cual la secuencia de nucleótido original, desde el pb 2531736 hasta 2533865 (base de
20 datos de genoma del NCBI), incluye los genes *ptsH* y *ptsI*, se reemplaza con SEQ SQ0001. Esta deleción afecta al sistema de fosfotransferasa dependiente de PEP (PTS), lo que da como resultado que la captación de glucosa dependiente de PEP se inactive en la cepa GBE0901. La deleción de los genes *ptsHI* se
25 verifica mediante PCR y los oligonucleótidos 0635 y 0638 (dados

39

como SEQ RC0001 y RC0002, respectivamente) se utilizan como iniciadores. El producto de PCR de 0.4 Kpb resultante se somete a determinación de secuencia utilizando los mismos iniciadores.

La cepa GBE0901 se cultiva en medio LB y las células GBE0901 se hacen electrocompetentes. Las células GBE0901 electrocompetentes se transforman con un plásmido nombrado pKD46 (Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645) y después se siembran en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 30°C. La transformación de las células GBE0901 con el plásmido pKD46 genera la cepa GBE0902. El plásmido pGBE0688 presenta un gen de resistencia a espectinomicina colocado bajo el control de su propio promotor. La secuencia de este cassette de resistencia se indica en la Tabla 3 (SEQ SQ0002).

El plásmido pGBE0688 se utiliza como una plantilla con los iniciadores 0633 y 0634 (dados como SEQ RC0003 y RC0004, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1.3 kpb. Este producto de PCR de 1.3 kpb se transforma en bacterias GBE0902 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra después en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml) y se incuban durante toda la noche a 37°C para generar la cepa GBE0903. En la cepa GBE0903 se elimina la secuencia de ADN constituida por los genes *zwf*, *edd*, y *eda*. Estos genes codifican respectivamente para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una 6-fosfogluconato

deshidratasa, y una 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa. Esta secuencia de ADN eliminada que incluye los genes *zwf*, *edd*, y *eda* se reemplaza por un cassette de resistencia a espectinomicina. Con el fin de confirmar la delección efectiva de los genes *zwf*, *edd*, y *eda*, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 1036 y 1037 (dados como SEQ RC0005 y RC0006, respectivamente). Se obtiene un producto de PCR final de 1.9 Kpb. Este producto de PCR de 1.9 Kpb se somete a determinación de secuencia con los mismos iniciadores 1036 y 1037.

10 La cepa GBE0903 se siembra después en placas LB, se incuba a 37°C y las colonias aisladas se someten a tamizaje en placas MS (Richaud C, Mengin-Leucreulx D., Pochet S., Johnson EJ., Cohen GN. y Marliere P; The Journal of Biological Chemistry; 1993; Vol. 268; No. 36; pp. 26827-26835) con glucosa como la fuente de
15 carbono (2 g/L). Después de 48 horas de incubación a 37°C, las colonias se vuelven visibles y se transfieren a un medio líquido MS suministrado con glucosa (2 g/L). Esta incubación durante la noche a 37°C induce la pérdida del plásmido pKD46. Un aislado tiene un tiempo de duplicación de 7 horas y se nombró GBE1000.

20 La cepa GBE1000 se hace electrocompetente. Las células GBE1000 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46, y después se siembran en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 30°C. La transformación de las células GBE1000 con el plásmido pKD46
25 genera la cepa GBE1001.

El plásmido pGBE0687 presenta un gen de resistencia a apramicina colocado bajo el control de su propio promotor. La secuencia de este cassette de resistencia se indica en la Tabla 3 (SEQ SQ0003).

- 5 El plásmido pGBE0687 se utiliza como una plantilla junto con los iniciadores 0629 y 0630 (dados como SEQ RC0007 y RC0008, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1.2 Kpb. El producto de PCR de 1.2 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE1001 electrocompetentes y la mezcla de transformación se
- 10 siembra en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml). Las placas se incuban después durante la noche a 37°C para generar una nueva cepa nombrada GBE1005_pKD46. En la cepa GB1005_pKD46 el gen de fosfofructocinasa *pfkA*, se elimina y es reemplazado por el cassette de resistencia a apramicina. Para confirmar que ocurre la
- 15 delección del gen *pfkA*, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 0619 y 0620 (dados como SEQ RC0009 y RC0010, respectivamente). Este producto de PCR de 1.7 Kpb se somete a determinación de secuencia con los mismos iniciadores 0619 y 0620. Con el fin de confirmar la pérdida del plásmido pKD46, la cepa
- 20 GBE1005_pKD46 se siembra en placas LB y se incuba durante toda la noche a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se verifica sembrando las colonias aisladas en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante
- 25 creció en las placas LB incubadas a 37°C y se nombró GBE1005. Las

células GBE1005 no crecen en las placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

El cassette de espectinomicina está localizado en los loci correspondientes de los genes *zwf_edd_eda* y el cassette de apramicina está localizado en los loci correspondientes de los genes *pfkA*. Con el fin de cortar los cassettes resistentes que contienen los genes de resistencia a espectinomicina y apramicina, la cepa GBE1005 se transforma con el plásmido pCP20 (Datsenko KA. y Wanner BL., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, Vol. 97, No. 12, pp. 6640-6645) para obtener la cepa GBE1005_p. Después de incubar durante toda la noche en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) a 30°C, las colonias aisladas se vuelven a sembrar por estrías en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y se incuban durante toda la noche a 30°C. Las colonias aisladas se siembran después en placas LB y se incuban durante toda la noche a 42°C lo cual causa la pérdida del plásmido pCP20. Después, con el fin de confirmar el corte efectivo de los dos cassettes resistentes y la pérdida del plásmido pCP20, las colonias aisladas se vuelven a sembrar por estrías en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37°C, en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37°C, en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C y en placas LB, incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37°C y se nombró GBE1006. Las células GBE1006 no

8-1
63

crecen en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml), en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml), y en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

La cepa GBE1006 se hace electrocompetente, y las
5 células GBE1006 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46. Las células transformantes se siembran después en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incuban durante la noche a 30°C para obtener una nueva cepa nombrada GBE1010. Se genera un producto de PCR utilizando el plásmido
10 pGBE0688 como una plantilla y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEQ RC0011 y RC0012, respectivamente) como iniciadores. El producto de PCR de 1.3 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE1010 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra en placas LB que contienen
15 espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 37°C para generar la cepa GBE1014_pKD46. En la cepa GBE1014_pKD46 el gen de fosfofructocinasa *pfkB*, se elimina y la secuencia de ADN eliminada se reemplaza con un cassette que contiene el gen de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que
20 ocurrió la delección del gen *pfkB*, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 0621 y 0622 (dados como SEQ RC0013 y RC0014, respectivamente). Este producto de PCR de 2.2 Kpb final se somete a determinación de secuencia utilizando los mismos iniciadores 0621 y 0622.

25 Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la

cepa GBE1014_pKD46 se siembra en placas LB y las placas se incuban durante la noche a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirma sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C, y en
5 placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante que crece en placas LB incubadas a 37°C se nombra GBE1014. Las células GBE1014 no crecen en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

10

EJEMPLO 2

Construcción de la cepa GBE0929

La cepa GBE0901 se siembra en placas LB a 37°C y las colonias aisladas se someten a tamizaje en placas MS con glucosa
15 como la fuente de carbono (2 g/L). Después de 48 horas de incubación a 37°C, las colonias se vuelven visibles. Un aislado tiene un tiempo de duplicación de 5 horas y se nombra GBE0929.

EJEMPLO 3

20

Construcción de la cepa GBE1344

La construcción comienza con la cepa nombrada GBE0129. GBE0129 es una bacteria *Escherichia coli* MG1655 (ATCC #700926).

25

La cepa GBE0129 se cultiva en medio LB y las células

4/5

GBE0129 se hacen electrocompetentes. Las células GBE0129 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46, y después los transformantes se siembran en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 30°C para generar una nueva cepa nombrada GBE0170.

Se genera un producto de PCR utilizando el plásmido pGBE0687 como una plantilla y los oligonucleótidos 0633 y 0634 (dados como SEQ RC0003 y RC0004, respectivamente) como iniciadores. El producto de PCR de 1.2 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE0170 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 37°C. Esta incubación provoca la pérdida del plásmido pKD46 y lleva a la creación de una nueva cepa nombrada GBE1339. En la cepa GBE1339 la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa codificada por el gen *zwf*, la 6-fosfogluconato deshidratasa codificada por el gen *edd* y la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa codificada por el gen *eda* están inactivas. Los genes secuenciales *zwf*, *edd*, y *eda* se eliminan y reemplazan con un cassette que contiene el gen de resistencia a apramicina. Para confirmar que la delección de los genes *zwf*, *edd*, y *eda* fue efectiva, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 1036 y 1037 (dados como SEQ RC0005 y RC0006, respectivamente). Este producto de PCR de 1.8 Kpb se somete a determinación de secuencia con los mismos iniciadores 1036 y 1037.

La cepa GBE1339 se hace electrocompetente, y las

células GBE1339 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46. Los transformantes se siembran después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 30°C para generar la cepa GBE1340. Se

5 efectúa un producto de PCR utilizando el plásmido pGBE0688 como una plantilla y los oligonucleótidos 0629 y 0630 (dados como SEQ RC0007 y RC0008, respectivamente) como iniciadores. El producto de PCR de 1.3 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE1340 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra en

10 placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 37°C para generar la cepa GBE1341_pKD46. En la cepa GB1341_pKD46 el gen *pfka* que codifica para una fosfofructocinasa es reemplazado por el gen de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que la delección del gen

15 *pfkA* fue efectiva, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 0619 y 0620 (dados como SEQ RC0009 y RC0010, respectivamente). Este producto de PCR de 1.8 Kpb se somete a determinación de secuencia con los mismos iniciadores 0619 y 0620. Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46 para la cepa

20 GBE1341_pKD46, Las células GBE1341_pKD46 se siembran en placas LB y se incuban a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se verifica sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C y en placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante que

25 crece en placas LB incubadas a 37°C es GBE1341. GBE1341 no

crece en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

Con el fin de cortar los cassettes resistentes que contienen los genes de resistencia a apramicina y espectinomicina, los cuales están respectivamente localizados en los loci anteriores de los genes *zwf_edd_eda* y *pfkA*, la cepa GBE1341 se transforma con el plásmido pCP20 para obtener una nueva cepa nombrada GBE1341_p. Después de incubar durante toda la noche en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) a 30°C, las colonias aisladas se vuelven a sembrar por estrías en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) para otra incubación durante la noche a 30°C. Las colonias aisladas se siembran después en placas LB y se incuban durante toda la noche a 42°C. Esta incubación a 42°C provoca la pérdida del plásmido pCP20. Eventualmente con el fin de confirmar el corte de los dos cassettes resistentes y la pérdida del plásmido pCP20, las colonias aisladas se vuelven a sembrar por estrías en placas LB que contienen espectinomicina (50ug/ml) y se incuban durante toda la noche a 37°C, en placas LB suministradas con apramicina (50 ug/ml) e incubadas durante toda la noche a 37°C, en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) e incubadas durante toda la noche a 30°C y en placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa generada que crece en placas LB incubadas a 37°C se nombró GBE1342. Las células GBE1342 no crecen en placas LB suministradas con espectinomicina (50 ug/ml), en placas LB suministradas con apramicina (50 ug/ml) y en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml).



La cepa GBE1342 se hace electrocompetente, y las células GBE1342 se transforman con el plásmido pKD46. Los transformantes se siembran después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y se incuban durante toda la noche a 30°C para obtener la cepa GBE1343. Se efectúa un producto de PCR y se utiliza el plásmido pGBE0688 como una plantilla y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEQ RC0011 y RC0012, respectivamente) como iniciadores. El producto de PCR de 1.3 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE1343 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml) seguido por una incubación durante la noche a 37°C. Se genera una nueva cepa y se nombra GBE1344_pKD46. En la cepa GBE1344_pKD46 el gen *pfkb* que codifica para una fosfofructocinasa se elimina y se reemplaza con el cassette de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que la delección del gen *pfkB* fue efectiva, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 0621 y 0622 (dados como SEQ RC0013 y RC0014, respectivamente). El producto de PCR de 2.2 Kpb obtenido se somete a determinación de secuencia con los mismos iniciadores 0621 y 0622.

Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1344_pKD46 se siembra en placas LB y se incuba durante toda la noche a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirma sembrando las colonias aisladas en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) y se incuban durante toda la noche a 30°C y

9

en placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa generada que crece en placas LB incubadas a 37°C se nombró GBE1344. Las células GBE1344 no crecen en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml).

5

EJEMPLO 4

Construcción del plásmido pGBE0457

El propósito de esta sección es describir la construcción de un plásmido que permita la expresión de la fosfocetolasa YP_003354041.1 proveniente de *Lactococcus lactis* en cepas de *E. coli*.

El plásmido pGBE0123 es una versión modificada del plásmido pUC18 (New England Biolabs) y contiene un Sitio de Clonación Múltiple (MCS) modificado. El MCS original de pUC18 (del sitio de restricción *HindIII* hasta el sitio de restricción *EcoRI*) es reemplazado por la secuencia SQ0004 (Tabla 3). El plásmido pGB0123 permite la expresión de dos proteínas recombinantes bajo el control del promotor Plac.

20

ID del gen de fosfocetolasa	ID de la proteína fosfocetolasa	Organismo de origen	Plásmido de GeneArt® (Invitrogen)
8679043	YP_003354041.1	<i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i> KF147	pGBE0421

25

El gen de fosfocetolasa de *L. lactis* es optimizado en cuanto a codón por GeneArt® (Invitrogen) para expresión óptima en *Escherichia coli*. Además, se agrega una marca His en la posición 5' del gen y se agrega un codón de detención adicional en la posición 3' (SQ0005). La construcción de gen está flanqueada por los sitios de restricción *PacI* y *NotI* y provisto dentro del plásmido pGBE0421.

Para el experimento de clonación, los productos de PCR y los fragmentos de restricción se purifican en gel utilizando el estuche para extracción en gel QIAquick (Qiagen). Las enzimas de restricción y la ADN ligasa T4 (New England Biolabs. Beverly, MA) se utilizan de conformidad con las recomendaciones del fabricante.

El plásmido pGBE0421 se digiere con las enzimas de restricción *PacI* y *NotI* para crear un producto de 2.6 Kpb. El plásmido pGB0123 se digiere también con enzimas de restricción, *PacI* y *NotI* y se liga al fragmento de restricción de 2.6 Kpb. El plásmido resultante (pGBE0457) se somete a determinación de secuencia con los iniciadores 1061, 1062, 1063, 1064 y 1065 (dados como SEQ RC0015, RC0016, RC0017, RC0018 y RC0019 respectivamente).

La expresión de la fosfocetolasa proveniente de *Lactococcus lactis* se confirma en un gel de proteína, después de purificar la proteína recombinante utilizando una trampa de His (estuche Protino Ni-IDA 1000, Macherey Nagel). La purificación se procesa de conformidad con las recomendaciones del fabricante. La prueba enzimática, con enzima purificada, también se efectúa con el fin de detectar la actividad de fosfocetolasa en dos sustratos

diferentes: xilulosa-5-fosfato y fructosa-6-fosfato. El procedimiento experimental es el mismo que el utilizado por Leo Meile et al., (Journal of Bacteriology, Mayo de 2001, p.2929-2936), excepto que el pH de la solución es 7.5 y se agrega 1 mM de $MgCl_2$. Para esta prueba enzimática, se agregan 10 μg de proteína purificada a los 75 μl de la reacción. La actividad específica ($\mu moles$ de acetil-P formado/minuto/mg de proteína) es de 2815 $\mu moles$ /minuto/mg de proteína y 1941 $\mu moles$ /minuto/mg de proteína para D-xilulosa-5-fosfato y D-fructosa-6-fosfato, respectivamente.

10

EJEMPLO 5

Construcción del plásmido pGBE0096

La construcción de los plásmidos responsables de la producción de acetona en *E.coli* se basa en la construcción de plásmido descrita en Bermejo LL, Welker NE. y Papoutsakis ET., Applied and Environmental Microbiology, 1998. Vol. 64, No. 3, pp. 1076-1085.

Se pide la cepa *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824).

El ADN genómico de esta cepa está constituido por un cromosoma bacteriano y un plásmido nombrado pSOL1. Los genes *ctfA* y *ctfB* se amplifican mediante PCR a partir del plásmido pSOL1 con los iniciadores 0070 y 0071 (dados como SEQ RC0020 y RC0021, respectivamente). Se introducen un sitio de restricción *Bam*HI en el extremo 5' del producto de PCR y un sitio de restricción *Eco*RV en el

9/2

extremo 3' del producto de PCR. El producto de PCR de 1.3 Kpb resultante se digiere con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RV, después se liga con el pGB0689 (fagémidos pBluescript II, Agilent Technologies) el cual se digiere también con las enzimas de restricción, *Bam*HI y *Eco*RV. El plásmido resultante (pGBE0690) se somete a determinación de secuencia con los iniciadores 1066 y 1067 (dados como SEQ RC0022 y RC0023, respectivamente).

El gen *adc* y el terminador de gen se amplifican mediante PCR a partir del plásmido pSOL1 con los iniciadores 0072 y 0073 (dados como SEQ RC0024 y RC0025, respectivamente). La amplificación mediante PCR permite insertar un sitio de restricción *Eco*RV en el extremo 5' y un sitio de restricción *Sa*II en el extremo 3'. El producto de PCR de 0.8 Kpb resultante se digiere con las enzimas de restricción *Eco*RV y *Sa*II. El plásmido pGBE0690 se digiere también con las enzimas de restricción, *Eco*RV y *Sa*II y después se liga con el producto de PCR de 0.8 Kpb. El plásmido resultante (pGBE0691) se somete a determinación de secuencia con los iniciadores 1066, 1067, 1068 y 1069 (dados como SEQ RC0022, RC0023, RC0026 y RC0027, respectivamente).

El plásmido pGBE0691 se digiere con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sa*II para crear un producto de 2.2 Kpb. El fragmento de restricción de 2.2 Kpb contiene los genes *ctfA*, *ctfB* y *adc*. El plásmido pGBE0051 (pUC19, New England Biolabs) se digiere también con las enzimas de restricción, *Bam*HI y *Sa*II y después se liga con el fragmento de restricción de 2.2 Kpb. El plásmido

resultante (pGBE0692) se somete a determinación de secuencia con los iniciadores 1066, 1067, 1068 y 1069 (dados como SEQ RC0022, RC0023, RC0026 y RC0027, respectivamente).

El gen *thl* y su promotor *thl* correspondiente proveniente
5 del ADN genómico de *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) se amplifican mediante PCR con los iniciadores 0074 y 0075 (dados como SEQ RC0028 y RC0029, respectivamente). La amplificación mediante PCR permite insertar un sitio de restricción *KpnI* en el extremo 5' y un sitio de restricción *BamHI* en el extremo 3'. El
10 producto de PCR de 1.4 Kpb resultante se digiere con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI*, y de igual manera para el plásmido pGBE0692. El plásmido pGBE0692 digerido se liga con el producto de PCR de 1.4 Kpb. El plásmido resultante, pGBE0693, se somete a determinación de secuencia con los iniciadores 1066, 1067, 1068,
15 1069, 1070, 1071, 1072, 1073 y 1074 (dados como SEQ RC0022, RC0023, RC0026 RC0027, RC0030, RC0031, RC0032, RC0033 y RC0034, respectivamente).

El plásmido pGBE0124 es una versión modificada del plásmido pSU18 (Borja Bartolomé, Yolanda Jubete, Eduardo Martínez
20 y Fernando de la Cruz, Gene, 1991, Vol. 102, Fascículo 1, pp. 75-78) y éste contiene un Sitio de Clonación Múltiple (MCS) modificado. El MCS original de pSU18 (desde el sitio de restricción *EcoRI* hasta el sitio de restricción *HindIII*) es reemplazado por la secuencia SEQ SQ0006 (Tabla 3). El plásmido pGB0124 permite la expresión de dos
25 proteínas recombinantes bajo el control del promotor Plac. El

94

plásmido pGBE0693 se digiere con las enzimas de restricción *KpnI* y *SaI* para crear un producto de 3.5 Kpb. El plásmido pGBE0124 se digiere también con las enzimas de restricción *KpnI* y *SaI*, y después se liga al fragmento de restricción de 3.5 Kpb. El plásmido resultante (pGBE0096) se somete a determinación de secuencia con los iniciadores 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073 y 1074 (dados como SEQ RC0022, RC0023, RC0026 RC0027, RC0030, RC0031, RC0032, RC0033 y RC0034, respectivamente).

10

EJEMPLO 6

Producción de acetona por las cepas GBE1346 y GBE1347

Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes

15 La cepa GBE0129 se hace electrocompetente, y las células GBE0129 electrocompetentes se transforman con el plásmido pGBE0096. Los transformantes se siembran después en placas LB que contienen cloranfenicol (25 ug/ml) y las placas se incuban durante la noche a 30°C para generar la cepa GBE0329.

20 La cepa GBE1344 se hace electrocompetente, y las células GBE1344 electrocompetentes se transforman con ambos plásmidos pGBE0457 y pGBE0096. Los transformantes se siembran después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y cloranfenicol (25 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche
25 a 30°C para obtener la cepa GBE1345.

24/05

Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE0329 y GBE1345 se someten a tamizaje en placas MS que contienen glucosa como la fuente de carbono (2 g/L) y cloranfenicol (25 ug/ml). Estas placas se incuban a 30°C para obtener las cepas GBE1346 y GBE1347 respectivamente. Después de 4 días de incubación a 30°C, las colonias se transfieren a medio MS líquido que contiene glucosa (2 g/L) y cloranfenicol (25 ug/ml) y se incuban 3 días a 30°C.

Descripción de las condiciones de los matraces

Para los experimentos de fermentación, se utiliza un medio MS con 200 mM de fosfato dipotásico en lugar de 50 mM de fosfato dipotásico. El medio resultante se nombró MSP.

400 ml de medio MSP líquido que contiene glucosa (10 g/L) y cloranfenicol (25 ug/ml), se inoculan ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE1346 o con pre-cultivo de la cepa GBE1347. La DO_{600} inicial es 0.1. Los 400 ml de cultivo se incuban en botellas de 500 ml, selladas con una tapa roscada, a 30°C, 70 rpm de velocidad. Se toman alícuotas de 2 ml después de 1 día, 2 días, 3 días, 6 días, 7 días y 8 días. Para las muestras de cada alícuota, las botellas se abren durante 10 segundos.

Descripción de los métodos analíticos

Las alícuotas se filtran y se determina la concentración de glucosa con el estuche de prueba para glucosa (HK) (GAHK20-1 KT, Sigma) de conformidad con las recomendaciones del fabricante. La

concentración de acetona se determina mediante cromatografía de gas utilizando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

- Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- 5 - Separación/no separación del inyector: $T^{\circ} = 250^{\circ}\text{C}$
- Horno:
 - 80°C durante 6 minutos
 - 10°C por minuto hasta 220°C
 - 220°C durante 7 minutos
- 10 • Flujo de la columna: 1.5 ml/minuto (Nitrógeno)
- FID del detector: $T^{\circ} = 300^{\circ}\text{C}$

Resultados

La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa] consumida
15 (mM) es más alta para la cepa GBE1347 que para la cepa GBE1346.

EJEMPLO 7

Producción de acetona por las cepas GBE1350 y GBE1351

20 Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes

La cepa GBE0929 se hace electrocompetente, y las células GBE0929 electrocompetentes se transforman con un plásmido nombrado pGBE0096. Los transformantes se siembran después en
25 placas LB suministradas con cloranfenicol (25 ug/ml) y las placas se

incuban durante la noche a 30°C para obtener la cepa GBE1348.

La cepa GBE1014 se hace electrocompetente, se transforma con ambos plásmidos pGBE0457 y pGBE0096. Los transformantes se siembran después en placas LB suministradas con
5 ampicilina (100 ug/ml) y cloranfenicol (25 ug/ml) y las placas se incuban durante la noche a 30°C para obtener la cepa GBE1349.

Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE1348 y GBE1349 se someten a tamizaje en placas MS que contienen glucosa como la fuente de carbono (2 g/L) y cloranfenicol (25 ug/ml).
10 Estas placas se incuban 4 días a 30°C para obtener la cepa GBE1350 y la cepa GBE1351 respectivamente. Las colonias aisladas después se transfieren a medio MS líquido que contiene glucosa (2 g/L) y cloranfenicol (25 ug/ml). Las células GBE1350 y GBE1351 se incuban a 30°C.

15

Descripción de las condiciones de los matraces

400 ml de medio MSP que contiene glucosa (10 g/L) y cloranfenicol (25 ug/ml) se inoculan ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE1350 o con pre-cultivo de la cepa GBE1351. La DO_{600} inicial es
20 0.1. Los 400 ml de cultivo se incuban en botellas de 500 mililitros, selladas con una tapa roscada, a 30°C, 170 rpm de velocidad. Se toman alícuotas de 2 ml después de 1 día, 2 días, 3 días, 6 días, 7 días y 8 días. Para las muestras de cada alícuota, las botellas se abren durante 10 segundos.

25

Descripción de los métodos analíticos

Las alícuotas se filtran y la concentración de glucosa se determina con el estuche de prueba para glucosa (HK) (GAHK20-1 KT, Sigma) de conformidad con las recomendaciones del fabricante.

- 5 La concentración de acetona se determina mediante cromatografía de gas utilizando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

- 10
 - Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
 - Separación/no separación del inyector: $T^{\circ} = 250^{\circ}\text{C}$
 - Horno:
 - 80°C durante 6 minutos
 - 10°C por minuto hasta 220°C
 - 220°C durante 7 minutos
- 15
 - Flujo de la columna: 1.5 ml/minuto (Nitrógeno)
 - FID del detector: $T^{\circ} = 300^{\circ}\text{C}$

Resultados

- La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa] consumida
- 20 (mM) es más alta para la cepa GBE1351 que para la cepa GBE1350.

25

20

15

10

5

TABLA DE RESULTADOS I

	GBE1346	GBE1347	GBE1350	GBE1351
Captación de glucosa dependiente de PEP (<i>ptsHI</i>)	+	+	-	-
Fosfoacetolasa heteróloga (<i>pkt</i>)	-	+	-	+
EMPP (<i>pfkAB</i>)	+	-	+	-
PPP (<i>zwf edd eda</i>)	+	-	+	-
Fructosa bisfosfatasa heteróloga (<i>fbp</i>)	-	-	-	-
Ruta de acetona heteróloga (<i>thl ctfAB adc</i>)	+	+	+	+
$\frac{[\text{acetona}]_{\text{producida}}}{[\text{glucosa}]_{\text{consumida}}}$	0.02	>0.02	0.04	0.14

EJEMPLO 8

Construcción del plásmido pGBE1020

El propósito de esta sección es describir la construcción
5 de un plásmido que permita la expresión de la fosfocetolasa
YP_003354041.1 de *Lactococcus lactis* y que permita también la
producción de acetona en cepas de *E. coli*.

El gen de fosfocetolasa de *L. lactis* se amplifica mediante
PCR a partir del plásmido pGBE0421 con los iniciadores 1516 y 1517
10 (dados como SEQ RC0035 y RC0036, respectivamente).

La amplificación mediante PCR permite insertar un sitio
de restricción *EcoRI* y un Sitio de Unión a Ribosoma (RBS) en el
extremo 5' y un sitio de restricción *KpnI* en el extremo 3'. El producto
de PCR de 2.5 Kpb resultante se digiere con las enzimas de
15 restricción *EcoRI* y *KpnI*. El plásmido pGBE0123 se digiere también
con las enzimas de restricción, *EcoRI* y *KpnI* y después se liga con el
producto de PCR de 2.5 Kpb. El plásmido resultante (pGBE0928) se
somete a determinación de secuencia con los iniciadores 1061, 1062,
1063, 1064 y 1065 (dados como SEQ RC0015, RC0016, RC0017,
20 RC0018 y RC0019, respectivamente).

El plásmido pGBE0096 se digiere con las enzimas de
restricción *KpnI* y *NotI* para crear un producto de 3.6 Kpb. El
plásmido pGBE0928 se digiere también con las enzimas de
restricción, *KpnI* y *NotI* y se liga al fragmento de restricción de 3.6
25 Kpb. El plásmido resultante (pGBE1020) se somete a determinación

101

de secuencia con los iniciadores 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002 y 2003 (dados como SEQ RC0037, RC0038, RC0039, RC0040, RC0041, RC0042, RC0043, RC0044, RC0045 y RC0046, respectivamente).

5

EJEMPLO 9

Construcción del plásmido pGBE1021

El propósito de esta sección es describir la construcción de un plásmido que permita la producción de acetona en cepas de *E. coli*.

El plásmido pGBE0096 se digiere con las enzimas de restricción *KpnI* y *NotI* para crear un producto de 3.6 Kpb.

El plásmido pGBE0123 se digiere también con las enzimas de restricción, *KpnI* y *NotI* y después se liga con el producto de PCR de 3.6 Kpb. El plásmido resultante (pGBE1021) se somete a determinación de secuencia con los iniciadores 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002 y 2003 (dados como SEQ RC0037, RC0038, RC0039, RC0040, RC0041, RC0042, RC0043, RC0044, RC0045 y RC0046, respectivamente).

EJEMPLO 10

Producción de acetona por las cepas GBE2264 y GBE2265

25

Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes

La cepa GBE0129 se hace electrocompetente, y las células GBE0129 electrocompetentes se transforman con el plásmido pGB1021. Los transformantes se siembran después en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incuban durante toda la noche a 30°C para generar la cepa GBE2262.

La cepa GBE1344 se hace electrocompetente, y las células GBE1344 electrocompetentes se transforman con el plásmido pGBE1020. Los transformantes se siembran después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 30°C para obtener la cepa GBE2263.

Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE2262 y GBE2263 se someten a tamizaje en placas MS que contienen glucosa como la fuente de carbono (2 g/L) y ampicilina (100 ug/ml). Estas placas se incuban a 30°C para obtener las cepas GBE2264 y GBE2265, respectivamente. Después de 4 días de incubación a 30°C, las colonias se transfieren a medio MS líquido que contiene glucosa (2 g/L), extracto de levadura (0.1 g/L) y ampicilina (100 ug/ml) y se incuban 3 días a 30°C.

Descripción de las condiciones de los matraces

El medio MSP líquido (200 ml) que contiene glucosa (10 g/L), extracto de levadura (0.1 g/L) y ampicilina (100 ug/ml), se inocula ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE2264 o con pre-cultivo

x3
103

de la cepa GBE2265. La DO_{600} inicial es 0.1. Los 200 ml de cultivo se incuban en botellas de 250 mililitros, selladas con una tapa roscada, a 30°C, 170 rpm de velocidad. Las alícuotas (2 ml) se toman después de 1 día, 2 días, 4 días, 5 días y 6 días. Para la muestra de cada

5 alícuota, la botella se abre durante 10 segundos.

Descripción de los métodos analíticos

Las alícuotas se filtran y la concentración de glucosa se determina mediante análisis de HPLC utilizando el HPLC Agilent

10 (1260 Infinity) y una columna Hi-Plex (Agilent, PL1170-6830) con una columna de guardia (Agilent, PL Hi-Plex H Guard Column, PL1170-1830).

- Volumen de inyección: 20 μ l
- Composición del solvente: $[H_2SO_4]$: 5.5 mM
- 15 - Temperatura de las columnas: 65°C
- RID (G1362A): temperatura ajustada: 35°C

La acetona se extrae de las alícuotas filtradas mezclando con acetato de metilo (1 volumen de acetato de metilo por 2

20 volúmenes de alícuota filtrada). La concentración de acetona se determina mediante cromatografía de gas utilizando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

- Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- Inyector:
- 25 • Relación de separación: 10

104
~~105~~

- $T^{\circ} = 250^{\circ}\text{C}$

- Horno:

- 50°C durante 9 minutos
- 20°C por minuto hasta 180°C
- 180°C durante 5 minutos
- Flujo de la columna: 1.5 ml/minuto (Nitrógeno)

- FID del detector: $T^{\circ} = 300^{\circ}\text{C}$

Resultados

10 La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa] consumida (mM) es más alta para la cepa GBE2265 que para la cepa GBE2264.

EJEMPLO 11

Construcción de la cepa GBE1283

15

La cepa GBE0929 se siembra en placas MS que contienen glucosa como la fuente de carbono (2 g/L). Una colonia aislada se transfiere a medio MS líquido que contiene glucosa (2 g/L) y se incuba 3 días a 30°C . El medio MS líquido (100 ml) que contiene glucosa (2 g/L) se inocula con pre-cultivo de la cepa GBE0929. La DO_{600} inicial es 0.1. Los 100 ml de cultivo se incuban en un Erlenmeyer de 1 L, a 30°C , 170 rpm de velocidad. Cuando la DO_{600} es superior a 1, se toma una alícuota del cultivo y se utiliza como inóculo para un cultivo nuevo (100 ml de cultivo incubados en Erlenmeyer de 1 L, a 30°C , 170 rpm de velocidad). La cepa GBE0929

20

25

se sub-cultiva 10 veces para obtener la cepa GBE1283.

EJEMPLO 12

Construcción de la cepa GBE2256

5

La cepa GBE1283 se cultiva en medio LB y las células GBE1283 se hacen electrocompetentes. Las células GBE1283 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46 y después se siembran en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml). Las
10 placas se incuban durante toda la noche a 30°C. La transformación de las células GBE1283 con el plásmido pKD46 genera la cepa GBE1284.

El plásmido pGBE0688 se utiliza como una plantilla junto con los iniciadores 0629 y 0630 (dados como SEQ RC0007 y RC0008,
15 respectivamente) para generar un producto de PCR de 1.2 Kpb. El producto de PCR de 1.2 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE1284 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incuban después durante la noche a 37°C para generar una
20 nueva cepa nombrada GBE2252_pKD46. En la cepa GB2252_pKD46 el gen de fosfofructocinasa *pfkA*, se elimina y es reemplazado por el cassette de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que ocurre la delección del gen *pfkA*, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 0619 y 0620 (dados como SEQ RC0009 y RC0010,
25 respectivamente). Este producto de PCR de 1.7 Kpb se somete a

100
105

determinación de secuencia con los mismos iniciadores 0619 y 0620. Con el fin de confirmar la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE2252_pKD46 se siembra en placas LB y se incuba durante toda la noche a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirma sembrando las colonias aisladas en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37°C y se nombró GBE2252. Las células GBE2252 no crecen en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

La cepa GBE2252 se hace electrocompetente, y las células GBE2252 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46. Las células transformantes se siembran después en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incuban durante la noche a 30°C para obtener una nueva cepa nombrada GBE2253.

Se genera un producto de PCR utilizando el plásmido pGBE0687 como una plantilla y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEQ RC0011 y RC0012, respectivamente) como iniciadores. El producto de PCR de 1.3 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE2253 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 37°C para generar la cepa GBE2256_pKD46. En la cepa GBE2256_pKD46 el gen de fosfofructocinasa *pfkB*, se elimina y la secuencia de ADN

eliminada se reemplaza con un cassette que contiene el gen de resistencia a apramicina. Para confirmar que ocurrió la delección del gen *pfkB*, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 0621 y 0622 (dados como SEQ RC0013 y RC0014, respectivamente).

- 5 Este producto de PCR final de 2.2 Kpb se somete a determinación de secuencia utilizando los mismos iniciadores 0621 y 0622.

Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE2256_pKD46 se siembra en placas LB y las placas se incuban durante la noche a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se
10 confirma sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante que crece en placas LB incubadas a 37°C se nombra GBE2256. Las células GBE2256 no crecen en placas LB suministradas con
15 ampicilina (100 ug/ml).

EJEMPLO 13

Construcción de la cepa GBE1518

20 El plásmido pGBE0688 se utiliza como una plantilla con los iniciadores 0633 y 1109 (dados como SEQ RC0003 y RC0047, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1.3Kpb. Este producto de PCR de 1.3 Kpb se transforma en bacterias GBE1284 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra
25 después en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml) y se

107-108

- incuban durante toda la noche a 37°C para generar la cepa GBE1433. En la cepa GBE1433 se elimina la secuencia de ADN constituida por el gen *zwf*. Esta secuencia de ADN eliminada que incluye el gen *zwf* se reemplaza por un cassette de resistencia a espectinomicina. Con
- 5 el fin de confirmar la delección efectiva del gen *zwf*, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 1036 y 1110 (dados como SEQ RC0005 y RC0048, respectivamente). Se obtiene un producto de PCR final de 1.5 Kpb. Este producto de PCR de 1.5 Kpb se somete a determinación de secuencia con los mismos iniciadores 1036 y 1110.
- 10 La cepa GBE1433 se hace electrocompetente. Las células GBE1433 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46, y después se siembran en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 30°C. La transformación de las células GBE1433 con el plásmido pKD46
- 15 genera la cepa GBE1436.
- El plásmido pGBE0687 se utiliza como una plantilla junto con los iniciadores 0629 y 0630 (dados como SEQ RC0007 y RC0008, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1.2 Kpb. El producto de PCR de 1.2 Kpb resultante se transforma en bacterias
- 20 GBE1436 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml). Las placas se incuban después durante la noche a 37°C para generar una nueva cepa nombrada GBE1441_pKD46. En la cepa GB1441_pKD46 el gen de fosfofructocinasa *pfkA*, se elimina y es reemplazado por el
- 25 cassette de resistencia a apramicina. Para confirmar que ocurre la

delección del gen *pfkA*, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 0619 y 0620 (dados como SEQ RC0009 y RC0010, respectivamente). Este producto de PCR de 1.7 Kpb se somete a determinación de secuencia con los mismos iniciadores 0619 y 0620.

- 5 Con el fin de confirmar la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1441_pKD46 se siembra en placas LB y se incuba durante toda la noche a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se verifica sembrando las colonias aisladas en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C, y en
- 10 placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37°C y se nombró GBE1441. Las células GBE1441 no crecen en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

- El cassette de espectinomicina está localizado en los loci
- 15 correspondientes del gen *zwf* y el cassette de apramicina está localizado en los loci correspondientes del gen *pfkA*. Con el fin de cortar los cassettes resistentes que contienen los genes de resistencia a espectinomicina y apramicina, la cepa GBE1441 se transforma con el plásmido pCP20 para obtener la cepa GBE1441_p.
- 20 Después de incubar durante toda la noche en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) a 30°C, las colonias aisladas se vuelven a sembrar por estrías en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml) y se incuban durante toda la noche a 30°C. Las colonias aisladas se siembran después en placas LB y se
- 25 incuban durante toda la noche a 42°C lo cual causa la pérdida del

104/110

plásmido pCP20. Después, con el fin de confirmar el corte efectivo de los dos cassettes resistentes y la pérdida del plásmido pCP20, las colonias aisladas se vuelven a sembrar por estrías en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37°C, en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37°C, en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C y en placas LB, incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37°C y se nombró GBE1448. Las células GBE1448 no crecen en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml), en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml), y en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

La cepa GBE1448 se hace electrocompetente, y las células GBE1448 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46. Las células transformantes se siembran después en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incuban durante la noche a 30°C para obtener una nueva cepa nombrada GBE1449. Se genera un producto de PCR utilizando el plásmido pGBE0688 como una plantilla y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEQ RC0011 y RC0012, respectivamente) como iniciadores. El producto de PCR de 1.3 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE1449 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 37°C para generar la cepa GBE1518_pKD46. En la cepa

110
111

GBE1518_pKD46 el gen de fosfofructocinasa *pfkB*, se elimina y la secuencia de ADN eliminada se reemplaza con un cassette que contiene el gen de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que ocurrió la delección del gen *pfkB*, se efectúa una amplificación con
5 PCR con los iniciadores 0621 y 0622 (dados como SEQ RC0013 y RC0014, respectivamente). Este producto de PCR de 2.2 Kpb final se somete a determinación de secuencia utilizando los mismos iniciadores 0621 y 0622.

Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la
10 cepa GBE1518_pKD46 se siembra en placas LB y las placas se incuban durante la noche a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se confirma sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante que
15 crece en placas LB incubadas a 37°C se nombró GBE1518. Las células GBE1518 no crecen en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

EJEMPLO 14

20

Construcción de la cepa GBE1420

El plásmido pGBE0688 se utiliza como una plantilla con los iniciadores 0633 y 0634 (dados como SEQ RC0003 y RC0004, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1.3 kpb. Este
25 producto de PCR de 1.3 kpb se transforma en bacterias GBE1284

244
112

electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra después en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml) y se incuban durante toda la noche a 37°C para generar la cepa GBE1287. En la cepa GBE1287 se elimina la secuencia de ADN constituida por los genes *zwf*, *edd*, y *eda*. Esta secuencia de ADN eliminada que incluye los genes *zwf*, *edd*, y *eda* se reemplaza por un cassette de resistencia a espectinomicina. Con el fin de confirmar la delección efectiva de los genes *zwf*, *edd*, y *eda*, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 1036 y 1037 (dados como SEQ RC0005 y RC0006, respectivamente). Se obtiene un producto de PCR final de 1.9 Kpb. Este producto de PCR de 1.9 Kpb se somete a determinación de secuencia con los mismos iniciadores 1036 y 1037.

La cepa GBE1287 se hace electrocompetente. Las células GBE1287 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46, y después se siembran en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 30°C. La transformación de las células GBE1287 con el plásmido pKD46 genera la cepa GBE1337.

El plásmido pGBE0687 se utiliza como una plantilla junto con los iniciadores 0629 y 0630 (dados como SEQ RC0007 y RC0008, respectivamente) para generar un producto de PCR de 1.2 Kpb. El producto de PCR de 1.2 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE1337 electrocompetentes y la mezcla de transformación se siembra en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml). Las placas se incuban después durante la noche a 37°C para generar una

42
113

nueva cepa nombrada GBE1353_pKD46. En la cepa GB1353_pKD46 el gen de fosfofructocinasa *pfkA*, se elimina y es reemplazado por el cassette de resistencia a apramicina. Para confirmar que ocurre la delección del gen *pfkA*, se efectúa una amplificación con PCR con los
5 iniciadores 0619 y 0620 (dados como SEQ RC0009 y RC0010, respectivamente). Este producto de PCR de 1.7 Kpb se somete a determinación de secuencia con los mismos iniciadores 0619 y 0620. Con el fin de confirmar la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1353_pKD46 se siembra en placas LB y se incuban durante toda
10 la noche a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se verifica sembrando las colonias aisladas en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37°C y se nombró GBE1353. Las
15 células GBE1353 no crecen en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

El cassette de espectinomicina está localizado en los loci correspondientes de los genes *zwf_edd_eda* y el cassette de apramicina está localizado en los loci correspondientes de los genes
20 *pfkA*. Con el fin de cortar los cassettes resistentes que contienen los genes de resistencia a espectinomicina y apramicina, la cepa GBE1353 se transforma con el plásmido pCP20 para obtener la cepa GBE1353_p. Después de incubar durante toda la noche en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) a 30°C, las colonias aisladas se
25 vuelven a sembrar por estrías en placas LB suministradas con

ampicilina (100 ug/ml) y se incuban durante toda la noche a 30°C. Las colonias aisladas se siembran después en placas LB y se incuban durante toda la noche a 42°C lo cual causa la pérdida del plásmido pCP20. Después, con el fin de confirmar el corte efectivo de los dos cassettes resistentes y la pérdida del plásmido pCP20, las colonias aisladas se vuelven a sembrar por estrías en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37°C, en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml), incubadas durante la noche a 37°C, en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C y en placas LB, incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante creció en las placas LB incubadas a 37°C y se nombró GBE1368. Las células GBE1368 no crecen en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml), en placas LB que contienen apramicina (50 ug/ml), y en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml).

La cepa GBE1368 se hace electrocompetente, y las células GBE1368 electrocompetentes se transforman con el plásmido pKD46. Las células transformantes se siembran después en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incuban durante la noche a 30°C para obtener una nueva cepa nombrada GBE1371. Se genera un producto de PCR utilizando el plásmido pGBE0688 como una plantilla y los oligonucleótidos 0631 y 0632 (dados como SEQ RC0011 y RC0012, respectivamente) como iniciadores. El producto de PCR de 1.3 Kpb resultante se transforma en bacterias GBE1371 electrocompetentes y la mezcla de

24/11/15

transformación se siembra en placas LB que contienen espectinomicina (50 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 37°C para generar la cepa GBE1420_pKD46. En la cepa GBE1420_pKD46 el gen de fosfofructocinasa *pfkB*, se elimina y la

5 secuencia de ADN eliminada se reemplaza con un cassette que contiene el gen de resistencia a espectinomicina. Para confirmar que ocurrió la delección del gen *pfkB*, se efectúa una amplificación con PCR con los iniciadores 0621 y 0622 (dados como SEQ RC0013 y RC0014, respectivamente). Este producto de PCR de 2.2 Kpb final se

10 somete a determinación de secuencia utilizando los mismos iniciadores 0621 y 0622.

Con el fin de inducir la pérdida del plásmido pKD46, la cepa GBE1420_pKD46 se siembra en placas LB y las placas se incuban durante la noche a 42°C. La pérdida del plásmido pKD46 se

15 confirma sembrando las colonias aisladas en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml), incubadas durante la noche a 30°C, y en placas LB incubadas durante la noche a 37°C. La cepa resultante que crece en placas LB incubadas a 37°C se nombró GBE1420. Las células GBE1420 no crecen en placas LB suministradas con

20 ampicilina (100 ug/ml).

EJEMPLO 15

Producción de acetona por las cepas GBE2268 y GBE2269

Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes

La cepa GBE1283 se hace electrocompetente, y las células GBE1283 electrocompetentes se transforman con el plásmido pGB1021. Los transformantes se siembran después en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incuban durante la noche a 30°C para generar la cepa GBE2266.

La cepa GBE1420 se hace electrocompetente, y las células GBE1420 electrocompetentes se transforman con el plásmido pGBE1020. Los transformantes se siembran después en placas LB suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 30°C para obtener la cepa GBE2267.

Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE2266 y GBE2267 se someten a tamizaje en placas MS que contienen glucosa como la fuente de carbono (2 g/L) y ampicilina (100 ug/ml). Estas placas se incuban a 30°C para obtener las cepas GBE2268 y GBE2269 respectivamente. Después de 4 días de incubación a 30°C, las colonias se transfieren a medio MS líquido que contiene glucosa (2 g/L), extracto de levadura (0.1 g/L) y ampicilina (100 ug/ml) y se incuban 3 días a 30°C.

Descripción de las condiciones de los matraces

Medio MSP líquido (200 ml) que contiene glucosa (10 g/L), extracto de levadura (0.1 g/L) y ampicilina (100 ug/ml), se inócula ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE2268 o con pre-cultivo

7/6
1/7

de la cepa GBE2269. La DO_{600} inicial es 0.1. Los 200 ml de cultivo se incuban en botellas de 250 mililitros, selladas con una tapa roscada, a 30°C, 170 rpm de velocidad. Las alícuotas (2 ml) se toman después de 1 día, 2 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días y 8 días. Para la muestra de cada alícuota, la botella se abre durante 10 segundos.

Descripción de los métodos analíticos

Las alícuotas se filtran y la concentración de glucosa se determina mediante análisis de HPLC utilizando el HPLC Agilent (1260 Infinity) y una columna Hi-Plex (Agilent, PL1170-6830) con una columna de guardia (Agilent, PL Hi-Plex H Guard Column, PL1170-1830).

- Volumen de inyección: 20 μ l
- Composición del solvente: $[H_2SO_4]$: 5.5 mM
- Temperatura de las columnas: 65°C
- RID (G1362A): temperatura ajustada: 35°C

La acetona se extrae de las alícuotas filtradas mezclando con acetato de metilo (1 volumen de acetato de metilo por 2 volúmenes de alícuota filtrada). La concentración de acetona se determina mediante cromatografía de gas utilizando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

- Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- Inyector:
- Relación de separación : 10

- $T^{\circ} = 250^{\circ}\text{C}$

- Horno:

- 50°C durante 9 minutos
- 20°C por minuto hasta 180°C
- 180°C durante 5 minutos
- Flujo de la columna: 1.5 ml/minuto (Nitrógeno)

- FID del detector: $T^{\circ} = 300^{\circ}\text{C}$

Resultados

10 La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa] consumida (mM) es más alta para la cepa GBE2269 que para la cepa GBE2268.

EJEMPLO 16

Producción de acetona por las cepas GBE2272 y GBE2273

15

Descripción de la transformación del plásmido en cepas relevantes

20 La cepa GBE2256 se hace electrocompetente, y las células GBE2256 electrocompetentes se transforman con el plásmido pGB1020. Los transformantes se siembran después en placas LB que contienen ampicilina (100 ug/ml) y las placas se incuban durante la noche a 30°C para generar la cepa GBE2270.

25 La cepa GBE1518 se hace electrocompetente, y las células GBE1518 electrocompetentes se transforman con el plásmido pGBE1020. Los transformantes se siembran después en placas LB

119

suministradas con ampicilina (100 ug/ml). Las placas se incuban durante toda la noche a 30°C para obtener la cepa GBE2271.

Las colonias aisladas provenientes de las cepas GBE2270 y GBE2271 se someten a tamizaje en placas MS que contienen glucosa como la fuente de carbono (2 g/L) y ampicilina (100 ug/ml). Estas placas se incuban a 30°C para obtener las cepas GBE2272 y GBE2273, respectivamente. Después de 4 días de incubación a 30°C, las colonias se transfieren a medio MS líquido que contiene glucosa (2 g/L), extracto de levadura (0.1 g/L) y ampicilina (100 ug/ml) y se incuban 3 días a 30°C.

Descripción de las condiciones de los matraces

Medio MSP líquido (200 ml) que contiene glucosa (10 g/L), extracto de levadura (0.1 g/L) y ampicilina (100 ug/ml), se inoculan ya sea con pre-cultivo de la cepa GBE2272 o con pre-cultivo de la cepa GBE2273. La DO_{600} inicial es 0.1. Los 200 ml de cultivo se incuban en botellas de 250 mililitros, selladas con una tapa roscada, a 30°C, 170 rpm de velocidad. Las alícuotas (2 ml) se toman después de 1 día, 2 días, 4 días, 5 días y 6 días. Para la muestra de cada alícuota, la botella se abre durante 10 segundos.

Descripción de los métodos analíticos

Se filtran las alícuotas y la concentración de glucosa se determina mediante análisis de HPLC utilizando el HPLC Agilent (1260 Infinity) y una columna Hi-Plex (Agilent, PL1170-6830) con una

117
120

columna de guardia (Agilent, PL Hi-Plex H Guard Column, PL1170-1830).

- Volumen de inyección: 20 µl
- Composición del solvente: [H₂SO₄]: 5.5 mM
- 5 - Temperatura de las columnas: 65°C
- RID (G1362A): temperatura ajustada: 35 °C

La acetona se extrae de las alícuotas filtradas mezclando con acetato de metilo (1 volumen de acetato de metilo por 2 volúmenes de alícuota filtrada). La concentración de acetona se
10 determina mediante cromatografía de gas utilizando el cromatógrafo de gases 450-GC (Bruker) y el siguiente programa:

- Columna: DB-WAX (123-7033, Agilent Technologies)
- Inyector:
 - Relación de separación: 10
 - 15 • T° = 250°C
- Horno:
 - 50°C durante 9 minutos
 - 20°C por minuto hasta 180°C
 - 180°C durante 5 minutos
 - 20 • Flujo de la columna: 1.5 ml/minuto (Nitrógeno)
- FID del detector: T° = 300°C

Resultados

La relación [acetona] producida (mM)/[glucosa] consumida
25 (mM) es más alta para la cepa GBE2273 que para la cepa GBE2272.

25

20

15

10

5

TABLA DE RESULTADOS II

	GBE2264	GBE2265	GBE2268	GBE2269	GBE2268	GBE2273	GBE2272	GBE2273
captación de glucosa dependiente de PEP (<i>ptsHI</i>)	+	+	-	-	-	-	-	-
Fosfoacetolasa heteróloga (<i>pkt</i>)	-	+	-	+	-	+	+	+
EMPP (<i>pfkAB</i>)	+	-	+	-	+	-	+	-
PPP (<i>zwf</i>)	+	-	+	-	+	-	+	-
EDP (<i>edd eda</i>)	+	-	+	-	+	+	+	+
Ruta de acetona heteróloga (<i>thf clfAB adc</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+
[acetona] _{producida} / [glucosa] _{consumida} (mM)	0,03	0,21	0,01	0,22	0,01	0,51	0,05	0,51
la relación reportada es la máxima observada								

REIVINDICACIONES

1.- Un microorganismo recombinante caracterizado por:

a) tener actividad de fosfoacetolasa;

- 5 b) (i) tener una ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifica(n) para fosfofructocinasa o para reducir la actividad de fosfofructocinasa en comparación con un
- 10 microorganismo no modificado genéticamente; o
- (ii) no poseer actividad de fosfofructocinasa;

y

- c) (i) tener un ramal oxidativo disminuido o inactivado de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por
- 15 inactivación del gen o genes que codifica(n) para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o para reducir la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente; o
- (ii) no poseer actividad de glucosa-6-fosfato
- 20 deshidrogenasa.

2.- El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 1 caracterizado también por:

d) tener actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa.

25 3.- El microorganismo recombinante de conformidad con

pa
123

la reivindicación 1 ó 2, en donde la EMPP está disminuida o inactivada adicionalmente por inactivación del gen o genes que codifica(n) para gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa o para reducir la actividad de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en
5 comparación con un microorganismo no modificado genéticamente.

4.- El microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 el cual ha sido modificado genéticamente para que tenga una actividad de fosfocetolasa incrementada.

10 5.- El microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho microorganismo es un hongo.

6.- El microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho
15 microorganismo es una bacteria.

7.- El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 6, en donde el gen o genes que codifica(n) para el transportador de PTS dependiente de PEP ha/han sido inactivados.

8.- El microorganismo recombinante de conformidad con
20 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado también porque éste:

e) es capaz de convertir acetil-CoA en acetona.

9.- El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado también porque éste:

25 f) es capaz de convertir acetona en isobuteno.

223
124

10.- El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado también porque éste:

g) es capaz de convertir acetona en propeno.

11.- El uso del microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la conversión de glucosa en acetil-CoA.

12.- El uso del microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para la conversión de glucosa en acetona.

13.- El uso del microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 9 para la conversión de glucosa en isobuteno.

14.- El uso del microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 10 para la conversión de glucosa en propeno.

15.- Un método para producir acetona a partir de glucosa que comprende los pasos de:

cultivar el microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en un medio apropiado; y

opcionalmente recuperar dicha acetona a partir del medio de cultivo.

16.- Un método para producir isobuteno a partir de glucosa que comprende los pasos de:

cultivar el microorganismo de conformidad con la reivindicación 9 en un medio apropiado; y

opcionalmente recuperar dicho isobuteno.

17.- Un método para producir propeno a partir de glucosa que comprende los pasos de:

5 cultivar el microorganismo de conformidad con la reivindicación 10 en un medio apropiado; y
opcionalmente recuperar dicho propeno.

10

15

RESUMEN

Se describen microorganismos recombinantes caracterizados por tener actividad de fosfoacetolasa, por tener una
5 ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por
inactivación del gen o genes que codifica(n) para fosfofructocinasa o
por reducción de la actividad de fosfofructocinasa en comparación
con un microorganismo no modificado y por tener un ramal oxidativo
disminuido o inactivado de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por
10 inactivación del gen o genes que codifica(n) para glucosa-6-fosfato
deshidrogenasa o por reducción de la actividad de glucosa-6-fosfato
deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no
modificado. Estos microorganismos se pueden utilizar para la
producción de metabolitos útiles tales como acetona, isobuteno o
15 propeno.

226
127**FIGURA 1**

Esquema 1. Producción de acetil-CoA a partir de glucosa-6-fosfato a través de la ruta de fosfocetolasa, Caso representativo 1

- 1a.) $2 \text{ D-glucosa-6-fosfato} = 2 \text{ D-fructosa-6-fosfato}$ (EC 5.3.1.9)
- 1b.) $\text{D-fructosa-6-fosfato} + \text{fosfato} = \text{fosfato de acetilo} + \text{D-eritrosa-4-fosfato} + \text{H}_2\text{O}$ (EC 4.1.2.22)
- 1c.) $\text{D-eritrosa-4-fosfato} + \text{D-fructosa-6-fosfato} = \text{sedoheptulosa-7-fosfato} + \text{D-gliceraldehído-3-fosfato}$ (EC 2.2.1.2)
- 1d.) $\text{Sedoheptulosa-7-fosfato} + \text{D-gliceraldehído-3-fosfato} = \text{D-ribosa-5-fosfato} + \text{D-xilulosa-5-fosfato}$ (EC 2.2.1.1)
- 1e.) $\text{D-ribosa-5-fosfato} = \text{D-ribulosa-5-fosfato}$ (EC 5.3.1.6)
- 1f.) $\text{D-ribulosa-5-fosfato} = \text{D-xilulosa-5-fosfato}$ (EC 5.1.3.1)
- 1g.) $2 \text{ D-xilulosa-5-fosfato} + 2 \text{ fosfato} = 2 \text{ fosfato de acetilo} + 2 \text{ D-gliceraldehído-3-fosfato} + 2 \text{ H}_2\text{O}$ (EC 4.1.2.22 y/o EC 4.1.2.9)
- 1h.) $3 \text{ fosfato de acetilo} + 3 \text{ CoA} = 3 \text{ acetil-CoA} + 3 \text{ fosfato}$ (EC 2.3.1.8)
-
- 1.) $2 \text{ D-glucosa-6-fosfato} + 3 \text{ CoA} = 3 \text{ acetil-CoA} + 2 \text{ D-gliceraldehído-3-fosfato} + 3 \text{ H}_2\text{O}$

Esquema 2. Producción de acetil-CoA a partir de glucosa-6-fosfato a través de la ruta de fosfocetolasa, Caso representativo 2

- 2a.) $2 \text{ D-glucosa-6-fosfato} = 2 \text{ D-fructosa-6-fosfato}$ (EC 5.3.1.9)
- 2b.) $\text{D-fructosa-6-fosfato} + \text{D-gliceraldehído-3-fosfato} = \text{D-xilulosa-5-fosfato} + \text{D-eritrosa-4-fosfato}$ (EC 2.2.1.1)
- 2c.) $\text{D-eritrosa-4-fosfato} + \text{D-fructosa-6-fosfato} = \text{sedoheptulosa-7-fosfato} + \text{D-gliceraldehído-3-fosfato}$ (EC 2.2.1.2)
- 2d.) $\text{Sedoheptulosa-7-fosfato} + \text{D-gliceraldehído-3-fosfato} = \text{D-ribosa-5-fosfato} + \text{D-xilulosa-5-fosfato}$ (EC 2.2.1.1)
- 2e.) $\text{D-ribosa-5-fosfato} = \text{D-ribulosa-5-fosfato}$ (EC 5.3.1.6)
- 2f.) $\text{D-ribulosa-5-fosfato} = \text{D-xilulosa-5-fosfato}$ (EC 5.1.3.1)
- 2g.) $3 \text{ D-xilulosa-5-fosfato} + 3 \text{ fosfato} = 3 \text{ fosfato de acetilo} + 3 \text{ D-gliceraldehído-3-fosfato} + 3 \text{ H}_2\text{O}$ (EC 4.1.2.9 y/o EC 4.1.2.22)

127
100**FIGURA 1 (cont.)**

2h.) 3 fosfato de acetilo + 3 CoA = 3 acetil-CoA +
3 fosfato (EC 2.3.1.8)

2.) 2 D-glucosa-6-fosfato + 3 CoA = 3 acetil-CoA +
2 D-gliceraldehído-3-fosfato + 3 H₂O

2.) 2 D-glucosa-6-fosfato + 3 CoA = 3 acetil-CoA + 2 D-
gliceraldehído-3-fosfato + 3 H₂O

LISTADO DE SECUENCIAS~~128~~
129

- <110> Scientist of Fortune S.A. et al.
- 5 <120> Microorganismo recombinante para la producción de
metabolitos útiles
- <130> T1761 PCT S3
- 10 <150> EP 11 17 3563.5
<151> 2011-07-12
- <160> 54
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 134
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Secuencia de nucleótido
- 25 <400> 1

121
130

aggctagact ttagttccac aacactaaac ctataagttg gggaaataca gtgtaggctg 60
gagctgcttc gaagttccta tacttttctag agaataggaa cttcggaata ggaactaagg 120
aggatattca tatg 134

5

<210> 2
<211> 1205
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Secuencia de nucleótido

<400> 2

15 agagcggccg ccaccgcggg aagttcctat actttctaga gaataggaaac ttcagctgat 60
agaaacagaa gccactggag cacctcaaaa acaccatcat aactaaatc agtaagttgg 120
cagcatcacc cgacgcactt tgcgcggaat aaatacctgt gacggaagat cacttcgcag 180
aataaataaa tcctggtgtc cctggtgata ccgggaagcc ctgggccaac ttttggcgaa 240
aatgagacgt tgatcggcac gtaagagggt ccaactttca ccataatgaa ataagatcac 300
20 taccgggctg attttttgag ttatcgagat tttcaggagc taaggaagct acatatgagt 360
gaaaaagtgc ccgccgagat ttcggtgcaa ctatcacaag cactcaacgt catcgggcgc 420
cacttggagt cgacgttgct ggccgtgcat ttgtacggct ccgcactgga tggcggattg 480
aaaccgtaca gtgatattga tttgctggtg actgtagctg caccgctcaa tgatgccgtg 540
cggcaagccc tgctcgtcga tctcttgag gtttcagctt cccctggcca aaacaaggca 600
25 ctccgcgcct tggaagtgac catcgtcgtg cacagtgaca tcgtaccttg gcgttatccg 660

130
131

gccaggcggg aactgcagtt cggagagtgg cagcgcaaag acatccttgc gggcatcttc 720
gagcccgcca caaccgattc tgacttggcg attctgctaa caaaggcaaa gcaacatagc 780
gtcgtcttgg caggttcagc agcgaaggat ctcttcagct cagtcccaga aagcgatcta 840
ttcaaggcac tggccgatac tctgaagcta tggaactcgc cgccagattg ggcgggcgat 900
5 gagcggaatg tagtgcttac tttgtctcgt atctggtaca ccgcagcaac cggcaagatc 960
ggcgcaaagg atgttgcctgc cacttgggca atggcacgct tgccagctca acatcagccc 1020
atcctgttga atgccaagcg ggcttatctt gggcaagaag aagattatctt gcccgctcgt 1080
gcggatcagg tggcggcgct cattaaattc gtgaagtatg aagcagttaa actgcttggt 1140
gccagccaat aagaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcgcat gcacgcagca 1200
10 tatgc 1205

<210> 3
<211> 1129
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido

20

<400> 3

agagcggcgg ccaccgcggg aagttcctat actttctaga gaataggaac ttcggggttca 60
tgtgcagctc catcagcaaa aggggatgat aagtttatca ccaccgacta ttgcaacag 120
tgccgttgat cgtgctatga tcgactgatg tcatcagcgg tggagtgcaa tgtcgtgcaa 180
25 tacgaatggc gaaaagccga gctcatcggt cagcttctca accttgggggt taccgccggc 240

132

gggtgtgctgc tgggccacag ctctttccgt agcgtccggc ccctcgaaga tgggccactt 300
ggactgatcg aggccctgcg tgctgcgctg ggtccgggag ggacgctcgt catgccctcg 360
tggtcaggtc tggacgacga gccgttcgat cctgccacgt cgcccgttac accggacctt 420
ggagttgtct ctgacacatt ctggcgccgt ccaaattgtaa agcgcagcgc ccatccattt 480
5 gcctttgcgg cagcggggcc acaggcagag cagatcatct ctgatccatt gcccctgcca 540
cctcactcgc ctgcaagccc ggtcgcccgt gtccatgaac tcgatgggca ggtacttctc 600
ctcggcgctg gacacgatgc caacacgacg ctgcatcttg ccgagttgat ggcaaagggt 660
ccctatgggg tgccgagaca ctgcaaccatt cttcaggatg gcaagttggt acgcgtcgat 720
tatctcgaga atgaccactg ctgtgagcgc tttgccttgg cggacagggtg gctcaaggag 780
10 aagagccttc agaaggaagg tccagtcggt catgcctttg ctcggttgat ccgctcccg 840
gacattgttg cgacagccct ggggtcaactg ggccgagatc cgttgatctt cctgcatccg 900
ccagaggcgg gatgogaaga atgcgatgcc gtcgccagt cgattggctg agtcatgag 960
cggagaacga gatgacgttg gaggggcaag gtgcgcgtga ttgctggggc aacacgtgga 1020
gcggatcggg gattgtcttt cttcagctcg ctgatgatat gctgacgctc aatgccgaag 1080
15 ttctatact ttctagagaa taggaacttc gcatgcacgc agcatatgc 1129

<210> 4
<211> 99
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido

132
133

<400> 4
aagcttgccg cccgggggtt aattaacctc cttagtttaa acctaggcat gcctctagag 60
gatccccggg taccgagctc gaattacctg caggaattc 99

5

<210> 5
<211> 2508
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Secuencia de nucleótido

<400> 5

15 ttaattaatg catcatcacc accatcacat gaccgaatat aacagcgaag cctatctgaa 60
aaaactggat aaatggtggc gtgcagcaac ctatctgggt gcaggtatga tttttctgaa 120
agaaaatccg ctgttttagcg ttaccggcac cccgattaaa gcagaaaatc tgaaagccaa 180
tccgattggt cattggggca ccgtagcgg tcagaccttt ctgtatgcac atgcaaatcg 240
cctgattaac aaatataacc agaaaatggt ttatatgggt ggtccgggtc atggtggtca 300
20 ggcaatggtt gttccgagct atctggatgg tagctatacc gaagcatatc cggaaattac 360
ccaggatctg gaaggtatga gccgtctgtt taaacgtttt agctttccgg gtggtattgg 420
tagccacatg accgcacaga cacgggtag cctgcatgaa ggtggtgaac tgggttatgt 480
tctgagccat gcaaccggtg caattctgga tcagccggaa caaattgcat ttgcagttgt 540
tggtgatggt gaagcagaaa ccggtccgct gatgaccagc tggcatagca tcaaatttat 600
25 caaccgaaa aacgatggtg ccattctgcc gattctggat ctgaatggct ttaaaatcag 660

134
133

	caatccgacc	ctgtttgcac	gtaccagtga	tgttgatata	cgcaaatttt	tcgaaggtct	720
	gggttatagt	ccgcgttata	ttgaaaacga	tgacatccat	gactacatgg	cctatcataa	780
	actggcagca	gaagtttttg	acaaagccat	tgaagatata	catcagattc	agaaagatgc	840
	ccgtgaagat	aatcgctata	agaatggtga	aattccggca	tggccgattg	ttattgcacg	900
5	tctgccgaaa	ggttgggggtg	gtcctcggtta	taatgattgg	agcgggtccga	aatttgatgg	960
	taaaggtatg	ccgatcgaac	atagctttcg	tgacacatcag	gttccgctgc	cgctgagcag	1020
	caaaaacatg	ggcaccctgc	cggaatttgt	taaatggatg	accagctata	agccggaaaac	1080
	cctgtttaat	gcagatggta	gcctgaaaga	agaactgcgc	gattttgcac	cgaaaggtga	1140
	aatgcgtatg	gcaagcaata	cggttaccaa	tgggtggtgtt	gattatagca	atctggttct	1200
10	gccggattgg	caagaatttg	caaatccgat	tagcgaaaac	aatcgtggta	aactgctgcc	1260
	ggataccaat	gataatatgg	atatgaacgt	gctgagcaaa	tatttcgccg	aaattgttaa	1320
	actgaacccg	accggttttc	gtctgtttgg	tccggatgaa	accatgagca	atcgtttttg	1380
	ggagatgttt	aaagtgacca	atcgtcagtg	gatgcagggt	atcaaaaatc	cgaacgatga	1440
	gtttattagt	ccggaaggtc	gcattattga	tagccagctg	agcgaacatc	aggcagaagg	1500
15	ttggctggaa	ggttataccc	tgaccggctg	taccgggtgtt	tttgcaagct	atgaaagttt	1560
	tctgcgtgtt	gttgatagca	tgctgaccca	gcactttaaa	tggattcgtc	aggcagcaga	1620
	tcagaaatgg	cgtcatgatt	atccgagcct	gaatgttatt	agcaccagca	ccgtttttca	1680
	gcaggatcat	aatggttata	cccatcaaga	tccgggtatg	ctgacccatc	tggcagagaa	1740
	aaaaagcgat	tttattcgtc	agtatctgcc	tgcatatggt	aataccctgc	tggccgtttt	1800
20	tgatcgtgca	tttcaggatc	gcagcaaaat	taaccatatt	gttgcaagca	aacagcctcg	1860
	tcagcagtgg	tttaccaaag	aagaagcaga	aaaactggcc	accgatggta	ttgcaaccat	1920
	tgattgggca	agcaccgcaa	aagatggtga	agccgttgat	ctggtttttg	caagtgccgg	1980
	tgcagaaccg	accattgaaa	ccctggcagc	actgcatctg	gttaatgaag	tttttccgca	2040
	ggccaaattt	cgctatgtta	atgttggtga	actgggtcgt	ctgcagaaaa	agaaaggtgc	2100
25	actgaatcaa	gaacgcgaac	tgagtgatga	agagttcgaa	aaatactttg	gtccgagcgg	2160

134
135

tacaccggtt atttttgggtt ttcatggcta tgaagatctg atcgagagca tcttttatca 2220
gcgtgggtcat gatggtctga ttgttcatgg ttatcgtgaa gatggtgata ttaccaccac 2280
ctatgatatg cgtgtttata gogaactgga tcgttttcat caggcaattg atgcaatgca 2340
ggttctgtat gtgaatcgta aagttaatca gggctctggcc aaagcattta ttgatcgtat 2400
5 ggaacgtacc ctggtgaaac attttgaagt tacccgtaat gaaggcgttg atattccgga 2460
atttaccgaa tgggtttgga gcgatctgaa aaagtaatga gcggccgc 2508

- <210> 6
- 10 <211> 86
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 6
gaattcgagc tcggtacccg gggatcctct agaggcatgc ctaggtttaa actaaggagg 60
ttaattaacc ccgcggccgc aagctt 86

- 20
- <210> 7
 - <211> 23
 - <212> ADN
 - 25 <213> Secuencia artificial

225/30

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 7

5 ggttcaattc ttcttttagc ggc

23

<210> 8

<211> 23

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15

<400> 8

ccgcaaaaac gacatccggc acg

23

20 <210> 9

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

137
136

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 9

caagtatacc ctggcttaag taccgggtta gttaacttaa ggagaatgac agagcggccg 60
5 ccaccgcggg 70

<210> 10

<211> 70

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15

<400> 10

gcaaaaaaac gctacaaaaa tgcccgatcc tcgatcgggc attttgactt gcatatgctg 60
cgtgcatgcg 70

20

<210> 11

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

127
130

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 11

5 cgcactttg cgcgttttc cc 22

<210> 12

<211> 24

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15

<400> 12

ggtgattttc agtgaggtct cccc 24

20 <210> 13

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

139
~~20~~

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 13

agacttcgga caacagattt cattttgcat tccaaagttc agaggtagtc agagcggccg 60

5 ccaccgcggg 70

<210> 14

<211> 70

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15

<400> 14

gcttctgtca tcggtttcag ggtaaaggaa tctgcctttt tccgaaatca gcatatgctg 60

cgtgcatgcg 70

20

<210> 15

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

240

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 15

5 ggcgctcacg atcttcgcac gcggc

25

<210> 16

<211> 27

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15

<400> 16

ccgcctcata ttgctgacaa agtgccg

27

20 <210> 17

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

141
250

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 17

actttccgct gattcgggtgc cagactgaaa tcagcctata ggaggaaatg agagcggccg 60

5 ccaccgcggg 70

<210> 18

<211> 70

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15

<400> 18

gttgccgaca ggttggtgat gattcccccata atgctggggg aatgtttttg gcatatgctg 60

cgtgcatgcg 70

20

<210> 19

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

249
142

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 19

5 ccacagcgcac caggcagtgg tgtgtcc

27

<210> 20

<211> 24

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15

<400> 20

gcactttggg taagccccga aacc

24

20 <210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

143

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 21

ccattcaggc tgcgcaactg

20

5

<210> 22

<211> 24

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15 <400> 22

gcgcgttggc cgattcatta atgc

24

<210> 23

20 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de nucleótido

~~243~~
1495

<400> 23

caatccgacc ctgtttgcac gtac

24

5

<210> 24

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 24

15

gctgocggat accaatgata atatgg

26

<210> 25

<211> 26

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

25

~~144~~
145

<400> 25

ccatattatc attggtatcc ggcagc

26

5 <210> 26

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 26

cccggggggat ccagaattta aaaggaggga tt

32

15

<210> 27

<211> 40

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

25 <400> 27

245
146

ctcgaggata tcaagaattc tttttaaaca gccatgggtc

40

<210> 28

5 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 28

tgtaaaacga cggccagt

18

15

<210> 29

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 29

25 caggaaacag ctatgacc

18

246
147

<210> 30

<211> 37

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

10

<400> 30

ctcgaggata tcaggaaggt gacttttatg ttaaagg

37

15 <210> 31

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 31

gcatgcgtcg acattaataa aataagagtt acc

33

25

145
~~140~~

<210> 32

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

10 <400> 32

cctcacggca aagtctcaag c

21

<210> 33

15 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 33

gccatgggtc taagttcatt gg

22

25

~~248~~
149

<210> 34

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 34

10 catgatttta aggggggtac catatgcata agtttaa

37

<210> 35

<211> 36

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

20

<400> 35

gttattttta aggatccttt ttagcacttt tctagc

36

25 <210> 36

149
150

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 36

ggcagaaagg gagaaactgt ag

22

10

<210> 37

<211> 22

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

20 <400> 37

tggaaagaat acgtgcaggc gg

22

<210> 38

25 <211> 22

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 38

gattacgcca agcttgcatg cc

22

10

<210> 39

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 39

20 ccggcctcat ctacaatact acc

23

<210> 40

<211> 23

25 <212> ADN

7/12

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

5

<400> 40

cccattattg ctgggtcaac tcc

23

10

<210> 41

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 41

cccggtacct cattactttt tcagatcgct ccaaaccc

38

20

<210> 42

<211> 50

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

~~152~~ 153

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

5 <400> 42

ggggaattca ggaggtgtac tagatgcac atcaccacca tcacatgacc

50

<210> 43

10 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 43

ccatagctcc acccatacca gagagc

26

20

<210> 44

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

~~15/19~~

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 44

5 gctattatta cgtcagcatc tcttgc

26

<210> 45

<211> 22

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15

<400> 45

gcaggcgaag ttaatggcgt gc

22

20 <210> 46

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

15/5

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 46

gatacgggggt aacagataaa ccatttc

27

5

<210> 47

<211> 26

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

15 <400> 47

ccctttctgc ctttaattac tacagg

26

<210> 48

20 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de nucleótido

155
166

<400> 48

gcatcaggat taaatgactg tgcagc

26

5

<210> 49

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 49

15 ggactagcgc ccattccaac tattcc

26

<210> 50

<211> 29

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

25

75/15

<400> 50

gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcc

29

5 <210> 51

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 51

gcattgcgtg tacaagagta acgag

25

15

<210> 52

<211> 22

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

25 <400> 52

cctgtccaag cttcatgtac gg

22

<210> 53

5 <211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de nucleótido

<400> 53

gcgcaagatc atgttacgg taaaataacc ataaaggata agcgagata gcatatgctg 60

cgtgcatgcg 70

15

<210> 54

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de nucleótido

<400> 54

25 cgctgtaac cggagctcat aggg

24

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: 2014/02/11/ AAAA MM DD 2014	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		Recorrido: 4	
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-28762	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 1 ARCHIVO:
1 EN FORMATO WORD, EL CUAL POR NO CUMPLIR CON LO
ESTIPULADO EN LA CIRCULAR UNICA NO FUE PROCESADO.

EL CD SE ENCUENTRA UBICADO EN EL FOLIO 159

160

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
 (Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
 (PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference T1761 PCT S3	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/EP2012/063685	International filing date (day/month/year) 12.07.2012	Priority date (day/month/year) 12.07.2011	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12N9/04			
Applicant Scientist of Fortune S.A.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>9</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand		Date of completion of this report	
11.02.2013		02.07.2013	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Giebeler, Katharina Telephone No. +49 89 2399-4898	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2012/063685

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-63 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-54 as originally filed

Claims, Numbers

1-16 filed with the letter of

11-02-2013

Drawings, Sheets

1/2, 2/2 as originally filed

- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):

162
161

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2012/063685

5. ☒ This report has been established:
- ☒ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-16</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-16</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-16</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2012/063685

152
103

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☐ to this Authority as an amendment on
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - * *If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Reference is made to the following documents:

- D1 US 2006/040365 A1 (KOZLOV YURY I [RU] ET AL KOZLOV YURY IVANOVICH [RU] ET AL) 23 February 2006
- D2 CHINEN ET AL: "Innovative metabolic pathway design for efficient l-glutamate production by suppressing CO₂ emission", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 103, no. 3, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 262-269, XP022028172
- D3 JEPPSSON M ET AL: "Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae strains improves the ethanol yield from xylose", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 68, no. 4, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 1604-1609, XP002254422

2 **Novelty (Article 33(2) PCT)**

The subject-matter of claims 1-16 is considered to be novel over the available prior art, especially since this authority is not aware of any known microorganism having phosphoketolase activity and lacking both phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase.

3 **Inventive step (Article 33(3) EPC)**

Moreover, the subject-matter of claims 1-16 is considered to involve an inventive step, the reasons being as follows.

- 3.1 The closest prior art appears to be represented by document D1 disclosing microorganisms which have been modified to increase the activity of phosphoketolase (see paragraph [0035]), and which have further been modified to have reduced activity of phosphofructokinase, for example by mutating or disrupting a gene encoding this enzyme (see paragraph [0183]; claim 5). Document D2 also discloses said subject-matter.
- 3.2 The microorganism of claim 1 differs therefrom in that it additionally has a diminished or inactivated oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP) by inactivation of the gene(s) encoding glucose-6-phosphate

244
165

dehydrogenase (Gluc-6-P DH) or by being genetically modified so as to reduce Gluc-6-P DH activity as compared to a non-modified microorganism, or in that it does not possess Gluc-6-P DH.

- 3.3 It has been pointed out by the applicant that it can be seen from the results shown in Table II on page 63 of the present description, and in particular from the comparison of strains GBE2272 and GBE2273, that the difference between the claimed invention and the prior art resulted in an improvement of yield by 900%.

This authority considers that in view of said data, it can be assumed that at least some improvement will also be achieved for other strains and for other products.

Therefore, the technical problem to be solved is seen in the provision of microorganisms which allow to obtain an improved yield.

- 3.4 The solution to this problem as provided by the subject-matter of claim 1 is considered to involve an inventive step. This authority takes the position that inactivating the pentose phosphate pathway, and in particular the gene encoding glucose-6-phosphate DH, would have been obvious to try for a person skilled in the art, but that there would not have been a reasonable expectation of success that this would indeed solve the problem posed.

This is because document D1 states that sugar metabolism via the Embden-Meyerhof and pentose phosphate pathways entails a loss of one carbon atom which results in decreased production yields of useful compounds derived from acetyl-CoA, whilst metabolism via phosphoketolase does not lead to this loss of CO₂ (see paragraph [0006]), and document D3 reported that the disruption of glucose-6-phosphate DH is suitable to lower the flux through the oxidative pentose phosphate pathway. In view of this disclosure, the skilled person may have contemplated that inactivating the gene encoding Gluc-6-P DH would also be a way to reduce CO₂ production.

However, given the unpredictable nature of such manipulations, as well as the failure reported in D2 to achieve an improvement by mutating the gene encoding pyruvate DH (see page 266, column 2, paragraph 2), this authority considers that there would have been no reasonable expectation for the skilled person that improved yields could indeed be achieved by using a strain with a reduced or deleted or absent Gluc-6-P DH gene.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2012/063685

3.5 In view of the above, an inventive step can be acknowledged for claim 1. The remaining claims 2-16 are also considered to involve in view of their direct or indirect back-reference to claim 1.

4 Industrial Applicability (Article 33(4) EPC)

The subject-matter of claims 1-16 is considered to be industrially applicable (Article 33(4) PCT).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

5 Due to the amendments to the claims, there is an inconsistency between the claims and the description, because features which are mandatory in the claims are presented as optional (i.e. merely preferred) in the description.

PCT/EP2012/063685
Scientist of Fortune S.A.
Our Ref.: T1761 PCT S3

CLAIMS

1. A recombinant microorganism characterized by:
 - a) having phosphoketolase activity;
 - b)
 - (i) having a diminished or inactivated Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMPP) by inactivation of the gene(s) encoding phosphofructokinase or by being genetically modified so as to reduce phosphofructokinase activity as compared to a non-genetically modified microorganism; or
 - (ii) not possessing phosphofructokinase activity;
 - and
 - c)
 - (i) having a diminished or inactivated oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP) by inactivation of the gene(s) encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase or by being genetically modified so as to reduce glucose-6-phosphate dehydrogenase activity as compared to a non-genetically modified microorganism; or
 - (ii) not possessing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity.
2. The recombinant microorganism of claim 1 further characterized by:
 - d) having fructose-1,6-bisphosphate phosphatase activity.
3. The recombinant microorganism of claim 1 or 2, wherein the EMPP is further diminished or inactivated by inactivation of the gene(s) encoding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase or by being genetically modified so as to reduce glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity as compared to a non-genetically modified microorganism.
4. The recombinant microorganism of any one of claim 1 to 3 which has been genetically modified to have an increased phosphoketolase activity.
5. The recombinant microorganism of any one of claims 1 to 4, wherein said microorganism is a fungus.

6. The recombinant microorganism of any one of claims 1 to 4, wherein said microorganism is a bacterium.
7. The recombinant microorganism of claim 6, wherein the gene(s) encoding the PEP-dependent PTS transporter has/have been inactivated.
8. The recombinant microorganism of any one of claims 1 to 7 further characterized in that it:
e) is capable of converting acetyl-CoA into acetone.
9. The recombinant microorganism of claim 8 further characterized in that it:
f) is capable of converting acetone into isobutene.
10. The recombinant microorganism of claim 8 further characterized in that it:
g) is capable of converting acetone into propene.
11. Use of the recombinant microorganism of any one of claims 1 to 10 for the conversion of glucose into acetyl-CoA.
12. Use of the recombinant microorganism of any one of claims 8 to 10 for the conversion of glucose into acetone.
13. Use of the recombinant microorganism of claim 9 for the conversion of glucose into isobutene.
14. Use of the recombinant microorganism of claim 10 for the conversion of glucose into propene.
14. A method for producing acetone from glucose comprising the steps of:
culturing the microorganism of any one of claims 8 to 10 in a suitable medium;
and
optionally recovering said acetone from the culture medium.
15. A method for producing isobutene from glucose comprising the steps of:
culturing the microorganism of claim 9 in a suitable medium; and
optionally recovering said isobutene.
16. A method for producing propene from glucose comprising the steps of:
culturing the microorganism of claim 10 in a suitable medium; and
optionally recovering said propene.

VOSSIUS & PARTNER



Patentanwälte Rechtsanwälte

VOSSIUS & PARTNER * POB 86 07 67 * 81634 München * Germany

European Patent Office

80298 MUNICH

PCT/EP2012/063685
Scientist of Fortune S.A.
Our Ref.: T1761 PCT S3

München, February 11, 2013
SZ/NB

This is further to our Request for International Preliminary Examination.

We herewith file new claims 1 to 16 which should form the basis for international preliminary examination as well as comments on the objections raised in the Written Opinion dated October 19, 2012.

1. AMENDMENTS IN THE CLAIMS

New claims 1 to 16 correspond to original claims 1 to 16 with the only exception that it has been specified in claims 1b), c) and in claim 3 that the reduced activity of the respective recited enzyme is due to a genetic modification. Support for this amendment can be found, e.g., on page 9, last line to page 10, first line, page 12, 4th paragraph and page 18, 2nd paragraph.

2. NOVELTY (ARTICLE 33(2) PCT)

- 2.1 In RE Item V, section 2 of the Written Opinion the Examiner objects to claims 1 to 17 as lacking novelty over naturally

PATENTANWÄLTE - DEUTSCHLAND
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
DR. DIETER MEUNEMANN, Dipl.-Phys.
DR. GERHARD HERMANN, Dipl.-Phys.
JOSEF SCHMIDT, Dipl.-Ing.
DR. HANS-RAINER JÄNICHEN, Dipl.-Biol.
DR. ALEXA V. UEXKÖLL, M.Sc.
DR. RUDOLF WEINBERGER, Dipl.-Chem.
DR. JOACHIM WACHENFELD, Biol.
DR. FRIEDRIKE STOLZENBURG, Dipl.-Biol.
RAINER VIKTOR, Dipl.-Ing.
DR. NATALIA BERRYMAN, Dipl.-Chem.
DR. JÖRGEN MEIER, Dipl.-Biol.
DR. STEFAN FICKERT, Dipl.-Chem., LL.M.
ARNOLD ASMUSSEN, Dipl.-Ing.(FH)
ELARD SCHENCK ZU SCHWEINSBERG, Dipl.-Ing., LL.M.
DR. DIRK HARMSEN, Dipl.-Chem.
DR. KATHARINA HAAS, Dipl.-Chem.
BARBARA BROZAT, Dipl.-Phys.
DR. SUSANNE FISCHER-KRUMMER, Apothekerin
DR. JÖRG HAHN, Dipl.-Chem.
DR. CHRISTOPH EISENMANN, Dipl.-Phys.
DR. MICHAELA WESSE, Apothekerin
DR. OLIVER SAHR, Dipl.-Phys.
DR. AXEL LEINS, Dipl.-Phys.
DR. CHRISTIAN SCHLÖB, Dipl.-Biochem.
OSWIN RIDDERBUSCH, Dipl.-Biochem.

DR. PAUL TAUCHNER, Dipl.-Chem. (Of Counsel)
DR. PETER A. RAUH, Dipl.-Chem. (Of Counsel)

PATENTANWALT - SCHWEIZ
EUROPEAN PATENT ATTORNEY
DR. WERNER BASTIAN, Dipl.-Biol.

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
DR. RENATE BARTH, Dipl.-Chem.
DR. URSULA HOFMANN, Dipl.-Chem.
DR. PETER EINMAYR, Dipl.-Chem.
DR. OLAF MALEK, Dipl.-Biol.
DR. ROGER ABSEMER, Biochem.
DR. DANIEL EISENBARTH, Dipl.-Biol.
DANA KRÄMER, Ph.D., Dipl.-Biochem.
KIMIO TAKAHASHI 1)
DR. ULRICH SENTNER, Dipl.-Biol.
DR. ALEXANDER SCHWENDEMANN, Dipl.-Biol.
DR. MAURIZIO DI STASIO, Dipl.-Biol.

PATENTANWALT - DEUTSCHLAND
DR. ANDREAS M. ROBINSON, Dipl.-Biol.

RECHTSANWÄLTE
DR. JOHANN PITZ
DR. THURE SCHUBERT
DR. MATHIAS KLEESPIES, LL.M.
SIMONE SCHÄFER
PAUL KRETSCHMAR, LL.M. 2)
DR. MARCUS V. WELSER, LL.M. 2)
BARBARA GUGGENMOS, Dipl.-Chem.
JENNIFER CLAYTON-CHEN
DR. GEORG ANDREAS RAUH
DR. STEFANIE NABROTZKI, LL.M.
CHRISTIAN HUFNAGEL, LL.M. 3)

CONSULTANTS
DR. CHRISTIAN GUGERELL 4)
YOSHIKAZU ISHINO
JENNIFER L. ENMON, Ph.D., J.D. 5)
RICHARD ENMON, Ph.D., J.D. 5)

1) Japanese Patent Attorney
2) Fachanwalt für gewerblichen Rechtsschutz
3) U.S. Attorney-at-Law (New York)
4) European Patent Attorney
5) Registered U.S. Patent Attorney

MAIN OFFICE
SIEBERTSTR. 3
81675 MÜNCHEN/GERMANY

POSTAL ADDRESS:
POB 86 07 67
81634 MÜNCHEN/GERMANY

Tel.: +49-(0)89-413 04-0
Fax: +49-(0)89-413 04-111
Fax trademarks: /-400

BERLIN OFFICE
JOACHIMSTALER STR. 34
10719 BERLIN/GERMANY

Tel.: +49-(0)30-340 609-501
Fax: +49-(0)30-340 609-512

Partnerschaftsregister Amtsgericht München PR 89

BASEL OFFICE (CH)
NADELBERG 3
4051 BASEL/SWITZERLAND

Tel.: +41-(0)61 560 1490
Fax: +41-(0)61 560 1488

HR Firmensummer CH-270.9.001.271-9

E-Mail:
patents@vossiusandpartner.com
trademarks@vossiusandpartner.com

www.vossiusandpartner.com

Liste aller Partner i.S.d. PartGG:
www.vossiusandpartner.com/partner

11/02/2013

occurring or commonly known microorganisms. The Examiner takes the position that this lack of novelty is due to an unclear definition of the claimed microorganisms which allegedly does not require a genetic modification. In the Examiner's view the features defined in claim 1(b) and (c) could also be achieved by varying the culture conditions.

2.2 We respectfully disagree with this assessment for the following reasons:

First, the objection lacks a substantial basis because it is based on a mere allegation of the Examiner without providing any proof that a microorganism, in particular, a recombinant microorganism, has indeed been publicly available in the prior art which displays feature a) to c) recited in claim 1. No evidence has been provided that discloses a microorganism which expresses phosphoketolase and shows a reduced phosphofructokinase activity and a reduced glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in comparison to a non-modified microorganism.

However, a novelty objection should not be based on mere speculation but should be substantiated by reference to a specific prior art disclosure.

Second, it is in our view not correct that claim 1 does not require any real difference on the genetic level. Namely, claim 1(b) and (c) specify that the microorganism has a reduced phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, respectively, as compared to a non-modified microorganism. This clearly implies that the claimed microorganisms are genetically modified and that they show a reduced activity of the respective enzyme in comparison to a microorganism which does not show such a modification.

In contrast, the "commonly known microorganisms" to which the Examiner refers cannot be novelty destroying because they do not show a reduced activity in comparison to a non-modified organism.

Although we think that this feature had been clear from the claims in any event, we amended claims 1 and 3 so as to specify that the microorganism has been genetically modified.

It is therefore requested that the novelty objection raised against claims 1 to 17 is withdrawn.

3. INVENTIVE STEP (ARTICLE 33(3) PCT)

3.1 In Re Item V, section 3 of the Search Opinion the Examiner also objects to all claims as lacking inventive step. The reasoning of the Examiner is that US 2006/0040365 (D1) (as well as Chinen (D2)) already describes microorganisms in which the phosphoketolase activity is increased. D1

17/0

furthermore already proposes the additional inactivation or reduction of activity of phosphofructokinase in such a microorganism (which would result in diminishing or inactivating the EMPP; see item b) of claim 1).

The technical problem when starting from this prior art is seen in the provision of further microorganisms which metabolize sugars via phosphoketolase.

The solution to the technical problem is the inactivation or the reduction of the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase.

The Examiner takes the position that this measure would have been obvious in view of the cited prior art. In this respect, the Examiner refers to D1 and takes the position that it can be derived from paragraph [0006] of this document that the skilled person was aware of the fact that the sugar metabolism via the EMPP and the PPP entails a loss of one carbon atom which leads to decreased production yields of useful compounds derived from acetyl-CoA.

From this the Examiner derives that it would have been an obvious measure to further modify a microorganism as described in D1 by inactivating or reducing the PPP, in particular by targeting the glucose-6-phosphate dehydrogenase. In this context, the Examiner also relies on Jeppson (D3) which describes that by reducing the PPP in xylulose-utilizing *S. cerevisiae* the flux to ethanol could be improved.

3.2 We respectfully disagree with this assessment for the following reasons:

First, we submit that the technical problem cannot be seen merely in the provision of further microorganisms which metabolize sugars via phosphoketolase. Rather the technical problem should be seen in the provision of microorganisms which allow to obtain an improved yield.

The solution according to the present invention is to reduce or abolish the pentose phosphate pathway (PPP) by reducing or abolishing the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity.

It is evident from the Example section that this measure indeed solves the technical problem, i.e. leads to an improved yield over the microorganisms proposed in D1 expressing a phosphoketolase and having a reduced EMPP.

In particular, Table II on page 63, which summarizes some of the results described in the Examples illustrates the following:

Table II compares the yield (here reflected in the amount of acetone (mM) produced in relation to the amount of glucose (mM) consumed) in different strains of *E. coli* which have been constructed as described in the preceding Examples. The *E. coli* strains GBE 2272 and GBE 2273 are of particular interest in this context. Both strains are derived from a common strain (comprising a modified

glucose uptake system, i.e. ptsHI minus) and contain a common plasmid from which phosphoketolase and the acetone pathway genes are expressed.

The results presented in Table II clearly show that microorganisms according to the present invention clearly show an improvement in yield.

Namely:

GBE2272 is phosphoketolase plus, EMPP minus (inactivation of phosphofructokinase) and has an acetone yield of 0.05 mM acetone/mM glucose. This strain corresponds to what is proposed in D1.

In contrast to this, GBE 2273, which differs from GBE 2272 only insofar as it is also PPP minus, shows a yield of 0.51 mM acetone/mM glucose. This corresponds to an improvement or more than 900% (!) which is a very large achievement in the field of fermentation.

Thus, in view of the above, it is evident that the technical problem in view of D1 is not simply the provision of further microorganisms which metabolize sugars via phosphoketolase but rather the provision of microorganisms which allow to obtain an improved yield. Moreover, it is evident from the experimental results provided in the present application that this technical problem has been solved.

Moreover, the claimed solution is not rendered obvious by the cited prior art and in particular not by D1 (or D2) in combination with D3 as will be set forth in the following.

It belonged to the common general knowledge that different pathways exist, in particular in bacteria, such as the EMPP and the PPP (and other pathways, e.g. the EDP). It was also known that the EMPP, together with pyruvate dehydrogenase, leads to the formation of acetyl-CoA and CO₂. The utilization of phosphoketolase to provide acetyl-CoA (via acetylphosphate) had been proposed in order to avoid the loss of carbon through CO₂. Accordingly, D1 describes that overexpressing phosphoketolase benefits production of compounds wherein the compounds are derived from acetyl-CoA. Moreover, D1 proposes in section [0183] that the reduction of the EMPP by reducing the activity of phosphofructokinase may be advantageous.

The relevant questions in connection with inventive step are whether, when starting from D1 (or D2) as the closest prior art and aiming at solving the technical problem,

- (i) it would have been obvious for the skilled person to try to solve the technical problem by diminishing or inactivating the oxidative branch of the PPP by abolishing or reducing the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase;

and, if so,

173

- (ii) whether there would have been a reasonable expectation of success that such a measure would lead to an improvement in the overall efficiency of producing acetyl-CoA or compounds derived therefrom.

In our view, these questions have to be answered in the negative.

As regards (i), i.e. the question whether it would have been obvious for the skilled person to try to solve the technical problem by diminishing or inactivating the oxidative branch of the PPP by abolishing or reducing the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, we submit that already this question has to be answered in the negative. In order to be obvious to try, there must, according to the established case law of the Technical Boards of Appeal of the EPO, be at least some pointer or hint in the closest prior art directing the skilled person into the direction of the claimed invention. No such pointer or hint can be found in D1 (or D2).

The Examiner merely alleges that "it would have been obvious from the disclosure of document D1 that additionally inactivating the pentose phosphate pathway would solve the problem posed" and that "the skilled person would have known from common general knowledge that the enzyme glucose-6-phosphate DH would be the prime candidate to achieve this".

However, these allegations lack any basis whatsoever and are clearly based on hindsight. First, nowhere can it be derived from D1 that an inactivation of the PPP could be beneficial. And although D1 mentions the PPP in paragraph [0006], it completely fails to provide any hint whatsoever that interfering with the PPP might have an additional beneficial effect. Thus, already the first statement made by the Examiner lacks any basis and is obviously based on an inadmissible hindsight approach. This is also evident from D2 (the authors of which are all inventors of D1) which actually reflects which sort of measures a skilled person might have considered promising for achieving a further possible effect on overall acetyl-CoA production. Namely, in D2 the authors pointed out that it would be ideal for acetyl-CoA to be supplied without using pyruvate dehydrogenase (PDH); see page 266, 2nd column, 2nd paragraph. Thus, in contrast to the allegation of the Examiner, not the targeting of the PPP would have been "the obvious" thing to do but rather targeting the PDH.

Apart from the above, there would also not have been a reasonable expectation of success that diminishing or inactivating the oxidative branch of the PPP by abolishing or reducing the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase could solve the technical problem. In particular, D2 does not only show that the Examiner's allegation is incorrect that targeting the PPP and choosing glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target would be an obvious measure, D2 also shows that even if the skilled person might have considered something as an obvious thing to do and would have had, from a theoretical point of view, an

expectation that such a measure should work, such an expectation might simply not be fulfilled. This is evident from page 266, 2nd column, 2nd paragraph of D2, where the authors of D2 state that they would have expected that inactivation of the pyruvate dehydrogenase should have a positive effect on the L-Glu productivity. The opposite was the case.

In view of this, also the disclosure in D3 (on which the Examiner relies and which is irrelevant for reasons that will be set forth below) that in xylulose-utilizing yeast the reduction of the oxidative PPP flux can improve ethanol yield from xylulose, could not have provided the skilled person with a reasonable expectation of success that in a completely different setting in which an organism is used which expresses phosphoketolase and in which the EMPP may be reduced, the reduction of the oxidative branch of the PPP would have any beneficial effect.

Apart from that, we also submit that the skilled person would have had no reason to combine the teaching of D1 (or D2) with that of D3 as done by the Examiner. Not only does D1 (or D2) not contain any pointer towards modifying the PPP, the modification of the PPP as described in D3 also had a completely different reasoning which would not have applied in the context of D1 (or D2). In particular, in D3 the problem occurred that xylitol is formed in large amounts as an unwanted by-product when using xylose utilizing yeast for the production of ethanol. The reason for this was seen in the concentrations of co-factors (NADPH and NADH; see page 1607, 2nd column, "Discussion"). It was found that the reduction of the oxidative PPP reduced the level of NADPH which in turn had a positive effect on the conversion of xylose into xylulose and only minor amounts of the unwanted by-product xylitol were produced (see page 1608, 1st column, 1st and 2nd full paragraph). All of this has nothing to do with the teaching of D1. There would only have been an incentive to combine the teaching of D1 (or D2) with that of D3 if there would be a hint in D1 (or D2) that it might be beneficial to reduce the level of NADPH in the microorganisms described in D1 (or D2) in order to obtain a better yield. Nothing like that can be found in D1 (or D2).

Thus, in view of the above, it is respectfully submitted that the objection for lack of inventive step as raised in the Written Opinion saying that the claimed solution is obvious in view of D1 (or D2) and D3 is untenable and should be withdrawn.

In addition, as set forth above, the claimed solution leads to a tremendous improvement (of more than 900%) in yield in comparison to the yield obtained by following the teaching of D1. This improvement is unexpected and in itself also supports inventive step.

4. CLARITY (ARTICLE 6 PCT)

In Re Item VIII, section 5 of the Written Opinion the Examiner raises an objection against claims 1 to 3 as regards clarity of the feature that the activity of a recited enzyme is reduced.

This objection should no longer apply in view of the amendments effected in claims 1b), c) and in claim 3.

5. REQUESTS

It is requested that international preliminary examination is carried out on the basis of the enclosed new claims 1 to 16 and that a positive international preliminary report on patentability is issued.

In case the Examiner does not agree to the above, it is requested that a further Written Opinion is issued and that the applicant is granted a further opportunity to respond to any possible outstanding objections.

Respectfully submitted,



Dr. Friederike Stolzenburg
European Patent Attorney

Enclosure

New claims 1 to 16 (marked-up version and clean copy thereof)

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

PARA REALIZAR EL EXAMEN DE

PATENTABILIDAD

177

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1.- Un microorganismo recombinante caracterizado por:

- a) tener actividad de fosfocetolasa;
- b) (i) tener una ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifica(n) para fosfofructocinasa o por estar genéticamente modificado para reducir la actividad de fosfofructocinasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente; o
- (ii) no poseer actividad de fosfofructocinasa;

y

- c) (i) tener un ramal oxidativo disminuido o inactivado de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifica(n) para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o por estar genéticamente modificado para reducir la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente; o
- (ii) no poseer actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

2.- El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 1 caracterizado también por:

- d) tener actividad de fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa.

3.- El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, en donde la EMPP está disminuida o inactivada adicionalmente por inactivación del gen o genes que codifica(n) para gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa o por estar genéticamente modificado para reducir la actividad de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado genéticamente.

4.- El microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 el cual ha sido modificado genéticamente para que tenga una actividad de fosfocetolasa incrementada.

5.- El microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho microorganismo es un hongo.

6.- El microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho microorganismo es una bacteria.

7.- El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 6, en donde el gen o genes que codifica(n) para el transportador de PTS dependiente de PEP ha/han sido inactivados.

127
130

8.- El microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado también porque éste:

e) es capaz de convertir acetil-CoA en acetona.

9.- El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado también porque éste:

f) es capaz de convertir acetona en isobuteno.

10.- El microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado también porque éste:

g) es capaz de convertir acetona en propeno.

11.- El uso del microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la conversión de glucosa en acetil-CoA.

12.- El uso del microorganismo recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para la conversión de glucosa en acetona.

13.- El uso del microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 9 para la conversión de glucosa en isobuteno.

14.- El uso del microorganismo recombinante de conformidad con la reivindicación 10 para la conversión de glucosa en propeno.

15.- Un método para producir acetona a partir de glucosa que comprende los pasos de:

cultivar el microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en un medio apropiado; y

opcionalmente recuperar dicha acetona a partir del medio de cultivo.

16.- Un método para producir isobuteno a partir de glucosa que comprende los pasos de:

cultivar el microorganismo de conformidad con la reivindicación 9 en un medio apropiado; y

opcionalmente recuperar dicho isobuteno.

120
179

17.- Un método para producir propeno a partir de glucosa que comprende los pasos de:

cultivar el microorganismo de conformidad con la reivindicación 10 en un medio apropiado; y

opcionalmente recuperar dicho propeno.

NCA\NCA\ID-259965\WPC20138

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DELEGATURA PARA LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
FORMULARIO PARA OTORGAR PODER A ABOGADO
EN LOS TRÁMITES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

1. Datos del otorgante

☐ Persona Natural ☒ Persona Jurídica

SCIENTIST OF FORTUNE S.A.

Nombre o denominación/Razón Social completa(En caso de que haya más de un solicitante, relaciónese en hoja adjunta)

Nombre del Representante

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del otorgante	
Luxemburgo	74 rue des Glacis, L-1628 Luxemburgo, Luxemburgo	
Dirección Electrónica	No. Fax	Número Telefónico
clientes@cavelier.com	2118650	3473611

2. Datos del Apoderado

Principal Luz Clemencia Suárez de Páez	35.456.344	23.555
Primer Suplente Nidia Osorio López	39.787.682	73.366
Segundo Suplente Oscar Correa Barbosa	79.524.634	71.027

Apellidos y Nombre Documento de Identificación T.P.(sólo abogados Profesionales)

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del Apoderado	
Colombiana	Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia	
Dirección Electrónica	No. Fax	Número Telefónico
cavelier@cavelier.com	2118650	3473611

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico.

Mediante el presente documento, la persona indicada en el punto 1 de este documento nombra a las personas que se identifican en el punto 2 como sus apoderados en los términos del artículo 66 del Código de Procedimiento Civil, para las actuaciones que se relacionan a continuación.

3. Actuaciones en cuestión:

Este poder concierne:

☒ Todas las solicitudes y/o registros actuales y futuros del otorgante.

☐ La(s) siguiente(s) solicitud(es) y/o registro(s):

NOMBRE	NÚMERO DE SOLICITUD O REGISTRO

Nota: Si el espacio anterior no es suficiente, por favor relacione las actuaciones en hoja anexa.

4. Alcance del poder:

☒ Confiero expresamente al (los) apoderado(s) todas las facultades legales para que represente mi(s) interés(es) en la(s) actuación(es) señalada(s) en el punto 3 de este documento, incluyendo:

- ☒ Desistir de la(s) solicitud(es) y de la demás actuaciones
- ☒ Renunciar a los derechos del registro de signos distintivos o de nuevas creaciones
- ☒ Transigir
- ☒ Recibir
- ☒ Conciliar
- ☒ Ratificar los actos de agentes oficiosos

5. Firma 16 noviembre 2012

Isabella Fischmann
Directora I. Fischmann

Nombre del Firmante

C.C.

Luz Clemencia Soárez

Firma del Apoderado

77123577055

Tarjeta Profesional

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

374

T 1761 CO S3 102
18

CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

Philippe MARLIERE

domiciliado(s) en

173, Rue de Rollegem, B-7700 Mouscron,
Bélgica

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es)
de la invención:

MICROORGANISMO RECOMBINANTE PARA LA
PRODUCCION DE METABOLITOS UTILES

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin
limitación, a favor de la sociedad

SCIENTIST OF FORTUNE S.A.

constituida y existente de conformidad con las leyes de
Luxemburgo

domiciliada en

7a, rue des Glacis, L-1628
Luxemburgo, Luxemburgo

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada
Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de
invención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

Philippe MARLIERE

of

173, Rue de Rollegem, B-7700 Mouscron, Belgium

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

RECOMBINANT MICROORGANISM FOR THE
PRODUCTION OF USEFUL METABOLITES

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour
of

SCIENTIST OF FORTUNE S.A.

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of
Luxembourg

domiciled in

7a, rue des Glacis, L-1628
Luxemburgo, Luxembourg

all rights inherent to said invention and that the above mentioned
company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding
patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy, Given and signed this January 17, 2014
en/in Luxembourg

por/by Philippe MARLIERE

Firma/Signature

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

103/102


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0012777

Bogotá D.C., Febrero 04 de 2014 - 12:27:04

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

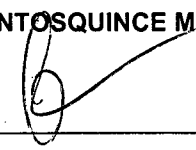
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	651483895	04/02/2014	22.509.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-028762- -00000-0000

Fecha: 2014-02-11 16:15:43
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVA SCR
Eve: 379 FASE NACIONAL II
Folios: 186

Código: 20138-844-001-5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Febrero 4 de 2014 - 12:27:09

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

104
105

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0012757

Bogotá D.C., Febrero 04 de 2014 - 12:27:04

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	651483895	04/02/2014	22.509.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
7	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	217.000.00
				\$217.000.00

SON: **DOSCIENTOS DIECISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-028762- -00000-0000

Fecha: 2014-02-11 16:15:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 184

186

Coto 20138-844-004-J

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 4 de 2014 - 12:27:08

104
105

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12N 009/004	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) SCIENTIST OF FORTUNE S.A.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 11173563.5	(32) Fecha 2011/07/12	(33) País EP
		(72) Inventor(es) PHILIPPE MARLIERE	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 2014/02/12		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 2013/01/17
	Fecha de presentación de la solicitud: 2012/07/12		N° publicación: WO 2013/007786 A1
	No. de solicitud PCT/EP2012/063685		
(54) Titulo: MICROORGANISMO RECOMBINANTE PARA LA PRODUCCION DE METABOLITOS UTILES			

Resumen:

Se describen microorganismos recombinantes caracterizados por tener actividad de fosfocetolasa, por tener una ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMPP) disminuida o inactivada por inactivación del gen o genes que codifica(n) para fosfofructocinasa o por reducción de la actividad de fosfofructocinasa en comparación con un microorganismo no modificado y por tener un ramal oxidativo disminuido o inactivado de la ruta de fosfato de pentosa (PPP) por inactivación del gen o genes que codifica(n) para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o por reducción de la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en comparación con un microorganismo no modificado. Estos microorganismos se pueden utilizar para la producción de metabolitos útiles tales como acetona, isobuteno o propeno.



No. 14-028762- -00000-0000

Fecha: 2014-02-11 16:15:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 184

186

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐