



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 513**

51 Int. Cl.:
C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04751134 .0**

96 Fecha de presentación : **03.05.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1751292**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Método para producir ácido succínico a partir de hidrolizados sin procesar.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2010

73 Titular/es: **UT-BATTELLE, L.L.C.**
Oak Ridge National Laboratory
P.O. Box 2008, MS 6498
Oak Ridge, Tennessee 37831-6498, US
UCHICAGO ARGONNE, L.L.C.

72 Inventor/es: **Donnelly, Mark;**
Nghiem, Nhuan, Phu y
Sanville-Millard, Cynthia, Y.

74 Agente: **Arizti Acha, Mónica**

ES 2 348 513 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

MÉTODO PARA PRODUCIR ÁCIDO SUCCÍNICO A PARTIR DE HIDROLIZADOS
SIN PROCESAR

DESCRIPCIÓN

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método de fermentación para producir ácido succínico, y a determinados mutantes bacterianos que pueden utilizar una miríada de azúcares para producir ácido succínico como producto de fermentación principal.

10

2. Antecedentes de la invención

Los ácidos carboxílicos son prometedores como posibles precursores de numerosos productos químicos. Por ejemplo, el ácido succínico puede servir como materia prima para precursores de plásticos tales como 1,4-butanodiol (BDO), tetrahydrofurano y gamma-butirolactona. Están en desarrollo nuevos productos derivados del ácido succínico, siendo el más notable de estos el poliéster que se fabrica uniendo ácido succínico y BDO. Generalmente, los ésteres del ácido succínico tienen el potencial de ser disolventes nuevos, "verdes" que pueden sustituir a disolventes más nocivos. En total, el ácido succínico puede servir como precursor para millones de libras de productos químicos anualmente a un valor de mercado total de más de mil millones de dólares. Junto con el ácido succínico, también otros ácidos 4-caton-dicarboxílicos, tales como ácido málico y ácido fumárico, son posibles materias primas.

20

La producción de estos ácidos carboxílicos a partir de materias primas renovables (en este caso a través de procesos de fermentación) es un camino para sustituir los métodos intensivos que consumen más energía de derivación de tales ácidos a partir de fuentes no renovables. El succinato es un producto intermedio de fermentaciones anaerobias por bacterias que producen propionato, pero esos procesos dan como resultado bajos rendimientos y concentraciones.

25

Las bacterias anaeróbicas del rumen, tales como *Bacteroides ruminicola* y *Bacteroides amylophilus* también producen succinato. Sin embargo, los organismos del rumen son característicamente inestables en procesos de fermentación.

30

Desde hace mucho tiempo se sabe que se produce una mezcla de ácidos a partir de la fermentación de *E. coli*, tal como se detalla en Stokes, J.L. 1949

“Fermentation of glucose by suspensions of *Escherichia coli*” J. Bacteriol. 57:147-158. Sin embargo, por cada mol de glucosa fermentada, se producen sólo 1,2 moles de ácido fórmico, 0,1-0,2 moles de ácido láctico y 0,3-0,4 moles de ácido succínico. Como tal, los esfuerzos para producir ácidos carboxílicos de manera fermentativa han dado
5 como resultado cantidades relativamente grandes de sustratos de crecimiento, tales como glucosa, que no se convierten en el producto deseado.

Algunas bacterias, tales como *A. succiniciproducens*, utilizadas en procesos de fermentación tal como se explica resumidamente en la patente estadounidense n.º 5.143.834 de Glassner *et al.*, producen de manera natural ácido succínico en litros
10 moderados sólo hasta aproximadamente 35-40 gramos por litro (g/l). Se ha mostrado que la cepa huésped *A. succiniciproducens* no es altamente osmotolerante porque no tolera concentraciones altas de sales y además se inhibe mediante concentraciones moderadas de producto. Por último, *A. succiniciproducens* presenta problemas de
15 manejo porque como anaerobio obligado, los procedimientos que usan el organismo deben realizarse en ausencia de oxígeno. Además, la preparación del medio para el inóculo requiere la adición de triptofano.

Los esfuerzos anteriores de los inventores para producir ácido succínico han dado como resultado el aislamiento y la utilización de una bacteria mutante. El mutante, disponible como número de registro de la ATCC 202021, es el sujeto de la
20 solicitud de patente estadounidense reexpedida n.º 09/429.693 (US RE37.3936; 25 de septiembre de 2001). La solicitud reexpedida n.º 09/429.693, enseña una cepa bacteriana que produce ácido succínico (AFP 111) que muta espontáneamente a partir de su precursor. El mutante puede crecer de manera fermentativa sobre glucosa para producir ácido succínico en altos rendimientos, mientras que sus precursores no lo
25 pueden hacer. Sin embargo, un inconveniente obvio de utilizar este método de producción de ácido succínico es su limitación a un único mutante.

Otros esfuerzos (patente estadounidense n.º 6.159.738) de los inventores han dado como resultado un método para elaborar cepas bacterianas que tienen una producción aumentada de ácido succínico. El método enseña que la alteración del gen
30 de la fosfotransferasa de *E. coli* provoca que las bacterias produzcan más ácido succínico. Un inconveniente de este método es su limitación a una única alteración.

Existe una necesidad en la técnica de un método para producir ácido succínico de manera fermentativa, por lo cual el método no esté relegado a un único mutante o gen. El método debe permitirse mediante cualquier organismo que tenga un genotipo

fácilmente determinado y particular. El método debe poder realizarse en condiciones relativamente inertes usando organismos robustos (es decir, aquellos que tienen altos umbrales de inhibición por retroalimentación), y también de modo que se obvie la necesidad de medidas de control medioambiental sofisticadas. El método debe producir resultados superiores utilizando mezclas de azúcares derivados de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos, puesto que estos sustratos ofrecen una fuente más barata de azúcares, y como tal, su uso puede reducir los costes de producción del ácido succínico.

El documento US 2003/017559 da a conocer un método para producir ácido succínico a partir de hidrolizados de calidad industrial, que comprende suministrar un organismo que contiene mutaciones para los genes *ptsG*, *pflB* y *ldhA*, permitir que dicho organismo acumule biomasa y permitir que dicho organismo metabolice el hidrolizado. Aunque se mencionan determinados mutantes de *E. coli* específicos (AFP 184 y AFP 400), ninguno de ellos eran accesibles al público en el momento de la publicación del documento US 2003/017559.

El método anterior según el documento US 2003/017559, en el que se usa el mutante de *E. coli* AFP 184, se conoce también de la presentación oral de Nghiem *et al.* "Production of succinic acid from lignocellulosic materials" en la 221 reunión de la ACS, 2001, páginas 1-24.

Vemuri *et al.*, "Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions", *Journal of Microbiology*, vol. 28, 2002, páginas 325-332, da a conocer un método para producir ácido succínico a partir de medios a base de glucosa, usando el mutante de *Escherichia coli* AFP 111. Se da a conocer también un método similar en Vemuri *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* Abril de 2002, 68(4): 1715-27.

SUMARIO DE LA INVENCION

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método de producción de ácido succínico que supera muchas de las desventajas de la técnica anterior.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de fermentación que produce altos rendimientos de ácido succínico.

Aún otro objeto de la presente invención es producir ácido succínico de manera fermentativa.

En resumen, se proporciona un método de producción de ácido succínico a partir de hidrolizados de calidad industrial según la reivindicación 1.

También se proporciona una bacteria mutante según la reivindicación 9.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente invención junto con los anteriores y otros objetos y ventajas pueden entenderse de la mejor manera a partir de la siguiente descripción detallada de la realización de la invención ilustrada en los dibujos, en la que:

10 la figura 1 es un gráfico que representa una producción potenciada de ácido succínico tras la transformación de una bacteria con un gen mutante, según características de la presente invención;

la figura 2 es un gráfico que representa la fermentación del hidrolizado industrial a través de un organismo mutante triple, según características de la presente invención; y

15 La figura 3 es un gráfico que representa la fermentación de azúcar sintética a través de un organismo mutante triple, según características de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Los inventores han desarrollado un método para producir de manera fermentativa altos rendimientos de ácido succínico. El método emplea mecanismos de represión de catabolitos alterados de organismos seleccionados de modo que permite a los organismos producir ácido succínico usando mezclas de materias primas de glucosa y distintas de glucosa.

25 Antes de exponer la invención en detalle, se proporcionan las siguientes definiciones si aparecen en el presente documento:

Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ADN de modo que provoca la replicación del segmento unido.

30 Un "replicón" es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, que puede replicarse bajo su propio control.

Un "casete" se refiere a un segmento de ADN que puede insertarse en un vector en sitios de restricción específicos. El segmento de ADN codifica para un polipéptido de interés, y el casete y los sitios de restricción están diseñados para

garantizar la inserción del casete en el marco de lectura apropiado para transcripción y traducción.

Una célula se ha “transfectado” mediante ADN exógeno o heterólogo cuando se ha introducido tal ADN dentro de la célula. Una célula se ha “transformado” mediante ADN exógeno o heterólogo cuando el ADN transfectado efectúa un cambio fenotípico.

ADN “heterólogo” se refiere a ADN no ubicado de manera natural en la célula, o en un sitio cromosómico de la célula. Preferiblemente, el ADN heterólogo incluye un gen extraño para la célula.

Una “molécula de ácido nucleico” se refiere a la forma polimérica de éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; “moléculas de ARN”) o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, o desoxicitidina; “moléculas de ADN”), o cualquier análogo de fosfoéster de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, o bien en forma monocatenaria, o bien una hélice bicatenaria. Son posibles hélices bicatenarias ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. La expresión molécula de ácido nucleico, y en particular molécula de ADN o ARN, sólo se refiere a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no la limita a cualquier forma terciaria particular. Por tanto, esta expresión incluye ADN bicatenario que se encuentra, entre otras, en moléculas de ADN lineal o circular (por ejemplo, fragmentos de restricción), plásmidos y cromosomas. Al tratar la estructura de moléculas de ADN bicatenarias particulares, pueden describirse en el presente documento secuencias según el convenio normal de dar sólo la secuencia en la dirección de 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que ha experimentado una manipulación biológica molecular.

Una molécula de ácido nucleico es “hibridable” con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede aparearse con la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica de la disolución (véase Sambrook *et al.*, citado anteriormente). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la “rigurosidad” de la hibridación. Para la selección preliminar de ácidos nucleicos homólogos, pueden usarse condiciones de hibridación de rigurosidad baja, correspondientes a una T_m de 55°C, por ejemplo, 5X SSC, SDS al 0,1%, leche al 0,25% y sin formamida; o formamida al 30%, 5X SSC, SDS al 0,5%).

Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderada corresponden a una T_m superior, por ejemplo, formamida al 40%, con 5X o 6X SCC. Las condiciones de hibridación de rigurosidad alta corresponden a la T_m más alta, por ejemplo, formamida al 50%, 5X o 6X SCC. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles apareamientos erróneos entre bases. La rigurosidad apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y el grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. A mayor el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor es el valor de la T_m para híbridos de ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a la T_m superior) de hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han deducido ecuaciones para calcular la T_m (véase Sambrook *et al.*, citado anteriormente, 9.50-0.51). Para hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los apareamientos erróneos pasa a ser más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook *et al.*, citado anteriormente, 1.1.7-11.8). Preferiblemente una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es de al menos aproximadamente 12 nucleótidos; preferiblemente al menos aproximadamente 18 nucleótidos; y más preferiblemente la longitud es de al menos aproximadamente 27 nucleótidos; y lo más preferiblemente de aproximadamente 36 nucleótidos.

La "recombinación homóloga" se refiere a la inserción de una secuencia de ADN extraño de un vector en un cromosoma. Preferiblemente, el vector selecciona como diana un sitio cromosómico específico para la recombinación homóloga. Para la recombinación homóloga específica, el vector contendrá regiones suficientemente largas de homología con secuencias del cromosoma para permitir la unión complementaria y la incorporación del vector en el cromosoma. Regiones más largas de homología, y mayores grados de similitud de secuencia, pueden aumentar la eficacia de la recombinación homóloga.

Una "secuencia codificante" de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que se transcribe y se traduce en un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Se determinan los límites de la secuencia codificante mediante un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia

codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc del ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, mamíferos), e incluso secuencias de ADN sintético. Si la secuencia codificante está destinada para su expresión en una célula eucariota, habitualmente se ubicaran una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción en 3' con respecto a la secuencia codificante.

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, terminadores y similares, que se proporcionan para la expresión de una secuencia codificante en una célula huésped. En células eucariotas, las señales de poliadenilación son secuencias de control.

Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN que puede unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante en el sentido de 3' (dirección 3'). Por ejemplo, la secuencia promotora está unida en su extremo 3' al sitio de iniciación de la transcripción y se extiende en el sentido de 5' (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (convenientemente definido por ejemplo, mediante mapeo con nucleasa S1), así como dominios de unión a proteína (secuencias consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa.

Una secuencia codificante está "bajo el control" de secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante para dar ARNm, que entonces se somete a corte y empalme de ARN en trans y se traduce para dar la proteína codificada por la secuencia codificante.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "homología de secuencia" en todas sus formas gramaticales se refiere a la relación entre proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluyendo proteínas de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia de inmunoglobulinas) y proteínas homólogas de diferentes especies (por ejemplo, cadena ligera de miosina, etc.) [Reeck *et al.*, Cell, 50:667 (1987)].

Por consiguiente, la expresión "similitud de secuencia" en todas sus formas gramaticales se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácido nucleico o aminoácidos de proteínas que no comparten un origen evolutivo

común [véase Reeck *et al.*, 1987, citado anteriormente]. Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término “homólogo,” cuando se modifica con un adverbio tal como “altamente,” puede referirse a similitud de secuencia y no a un origen evolutivo común.

5 Dos secuencias de ADN son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando al menos aproximadamente el 50% (preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, 95% ó 99,9%) de los nucleótidos son iguales a lo largo de la longitud definida de las secuencias de ADN. Pueden identificarse secuencias que son sustancialmente
10 homólogas comparando las secuencias usando software convencional disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de tipo Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas tal como se definen para ese sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas se encuentra dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, citado anteriormente;
15 DNA Cloning, vols. I & II, citado anteriormente; Nucleic Acid Hybridization, citado anteriormente.

 De manera similar, dos secuencias de aminoácidos son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando más del 30% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 60% son similares (funcionalmente
20 idénticos). Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican mediante alineación usando, por ejemplo, el programa múltiple GCG (Genetics Computer Group, Manual del programa para el paquete GCG, versión 7, Madison, Wis.).

 La expresión “correspondiente a” se usa en el presente documento para
25 referirse a secuencias similares u homólogas, ya sea la posición exacta idéntica o diferente de la molécula con la que se mide la similitud u homología. Por tanto, la expresión “correspondiente a” se refiere a la similitud de secuencia, y no a la numeración de los residuos de aminoácido o de bases de nucleótidos.

 Los mutantes y protocolos resultantes dan como resultado una razón de
30 succinato con respecto a materia prima de hasta 1,3:1, y normalmente de 0,9:1. Se logran acumulaciones de succinato de entre 60 g/l y 75 g/l. Las duraciones de protocolo típicas son de más de 70 horas, y habitualmente entre 120 y 170 horas. Por ejemplo, se obtienen rendimientos de 70 g/l tras 160 horas. El procedimiento es viable a partir de entre aproximadamente 25°C y 45°C, con un intervalo preferible de

aproximadamente 30 a 39°C. Es adecuado un pH de entre aproximadamente 5 y 9, con un intervalo más preferible de aproximadamente 6,1 y 7,2.

Los mutantes inventados son componentes especialmente viables del protocolo fermentativo puesto que tienen tolerancia aumentada a productos fermentativos. Por ejemplo, son factibles concentraciones de 72 g/l para succinato, 22 g/l para acetato, 14 g/l para etanol y 8 g/l para lactato sin inducir inhibición por retroalimentación.

Detalles de materias primas

Una característica destacada del método y el mutante inventados es la utilización directa de materias primas industriales. Puede utilizarse una miríada de materias primas, incluyendo, pero sin limitarse a agua de maceración ligera, hidrolizado lignocelulósico producido mediante diversos métodos de hidrólisis, disoluciones de azúcar derivada de maíz (tales como licor de maceración del maíz), lactosa de suero lácteo y otros azúcares de calidad industrial. Por ejemplo, hidrolizado lignocelulósico producido mediante hidrólisis con ácido concentrado, o hidrólisis con ácido diluido, hidrólisis enzimática o hidrolizados producidos mediante una combinación de estos procesos son todos adecuados. También son adecuadas disoluciones de azúcar derivada de maíz.

Generalmente, las materias primas industriales son mezclas de glucosa y otros azúcares, siendo el azúcar diferente de glucosa más común la xilosa. La figura 2 representa la utilización de glucosa y xilosa por uno de los mutantes inventados.

En vista de lo anterior, es adecuada cualquier materia prima que contenga azúcares de glucosa y/o diferentes de glucosa. Como tales, son apropiadas materias primas que contienen glucosa, sorbitol, xilosa, arabinosa, manosa, lactosa, ácido glucurónico, galactosa, fructosa y combinaciones de las mismas.

Detalles de organismos

El método inventado utiliza organismos según la reivindicación 9 que contienen alteraciones en el sistema de represión de catabolitos de los organismos. Específicamente, los inventores han encontrado que, puesto que existen alteraciones en el sistema de fosfotransferasa (pts), sistema de piruvato-formiato liasa (pfl) y sistema de lactato deshidrogenasa (ldh) de las bacterias, estas bacterias son adecuadas para su uso en el procedimiento inventado de producción de ácido

succínico. *pflLAB* y *ldhA* son los genes que codifican para piruvato-formato liasa y lactato deshidrogenasa fermentativa, respectivamente.

Los organismos que van a alterarse para incluir las tres desactivaciones se modifican mediante transducción en serie usando bacteriófago P1. Se utilizaron
5 protocolos de transducción con P1 convencionales, dándose a conocer un protocolo a modo de ejemplo en J. H. Miller, ed. Experiments in Molecular Genetics 1972 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Usando este método, pueden usarse cepas de bacterias de tipo natural o casi de tipo natural (por ejemplo, la cepa C600 de *E. coli*; n.º de registro de la ATTC 23724) para crear subcepas de mutantes
10 que carecen de uno, dos, o tres genes funcionales seleccionados de *pfl*, *ldh*, *ptsG*.

La “desactivación génica” se refiere a un proceso de silenciamiento de la expresión de un gen particular en una célula. El proceso de silenciamiento puede incluir, por ejemplo, la selección como diana de un gen o el bloqueo antisentido. La selección como diana de un gen se refiere a un proceso de introducción de un
15 constructo de ácido nucleico en una célula para que se recombine específicamente con un gen diana. El constructo de ácido nucleico inactiva el gen seleccionado como diana. La inactivación puede ser mediante la introducción de codones de terminación en una región codificante o la introducción de un sitio de represión en una secuencia reguladora. El bloqueo antisentido se refiere a la incorporación en una célula de
20 secuencias de expresión que dirigen la síntesis de ARN antisentido para bloquear la expresión de un gen diana. El ARN antisentido se hibrida con el ARNm del gen diana para inhibir la expresión.

Un ejemplo de una cepa de *E. coli* que comprende tres mutaciones que podía usarse en la invención se denominó AFP 184 (n.º de registro de la ATCC PTA 5132,
25 depositada el 9 de abril de 2003) (AFP=“*Alternative Feedstock Program*”, programa de materias primas alternativas). AFP 184 tiene la delección de *pfl*, la desactivación de *ldh* y la forma mutante diferente de *ptsG* insertada deliberadamente en una cepa casi de tipo natural de *E. coli*. También puede usarse otra cepa denominada AFP 415. AFP 415 difiere de AFP 184 sólo en que tiene la desactivación de *ptsG*. Funciona de
30 manera similar a AFP 184.

De manera sorprendente e inesperada, los inventores encontraron que el título y la tasa de metabolismo para AFP 184 y AFP 415 eran superiores a los derivados de W1485 dados a conocer en las patentes estadounidenses n.º 5.770.435 (ahora solicitud reexpedida n.º 09/429.693) y 6.159.738.

La tabla 1 proporciona una comparación de la producción de ácido succínico por AFP 184 y un derivado de W1485 (AFP 111). Es de interés que mientras el derivado de W1485 utilizó materias primas bastante refinadas, AFP 184 proporcionó valores todavía superiores con hidrolizados de calidad industrial.

5 También puede generarse una mutación que contiene las tres desactivaciones usando una bacteria que ya contiene una o dos de las anomalías genéticas, y entonces induciendo la/las desactivación(es) restante(s). En este caso, un organismo de partida viable es W1485, n.º de registro de la ATCC 12435. AFP 400 (n.º de registro de la ATCC PTA 5583, depositado el 10 de octubre de 2003) es una desactivación triple realizada deliberadamente. Contiene la deleción de *pfl* de August Bock, y se inserta en W1485 de David Clark de la Universidad de Illinois para producir FMJ123. Se produce FMJ123 de conformidad con el protocolo encontrado en P.K. Bunch *et al.* (1997) *Microbiology* 143, 187-195. AFT 400 también contiene la desactivación de *ldhA*, y se inserta en FMJ123 para producir DC1327. Se produce DC1327 de conformidad con el protocolo encontrado en Chatterjee *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, págs. 148-154, y se incorpora en el presente documento como referencia. AFP 400 contiene la desactivación de *ptsG*, tal como se describe en la referencia de Chatterjee.

Tabla 1: Comparación de la producción de ácido succínico por diferentes linajes de

20

<i>E.Coli</i>			
Cepa	Concentración máx.	Productividad máx.	Rendimiento (g/g de glucosa)
AFP111	51 g/l	0,87 g/lh	0,70
AFP 184	72 g/l	1,00 g/lh	1,00

25

También se elaboró AFP404 con desactivación triple (n.º de registro de la ATCC PTA 5133, depositado el 9 de abril de 2003) mediante introducción de tres desactivaciones en la cepa C600. AFP404 es similar a AFP 184 pero tiene una desactivación de *ptsG* en lugar de una mutación puntual del gen. También produce ácido succínico en un rendimiento de aproximadamente 1 mol/mol de glucosa.

30

También se encuentra un protocolo para el desarrollo de la mutación triple a partir de la cepa natural en R. Chatterjee *et al.* Los marcadores antibióticos típicos que indican la presencia de cada una de las desactivaciones incluyen, pero no se limitan a, Cam, Tet y Kan. Por tanto, se generaron nuevas cepas de *E. coli*, AFP 400 y AFP 404

que contiene las desactivaciones y los marcadores antibióticos. A continuación se detalla el protocolo:

Elaboración e introducción de un gen ptsG inactivado por inserción

5 Se clonó el gen ptsG nativo de *E. coli* mediante PCR a partir de ADN genómico preparado a partir de W1485 usando cebadores que seleccionan como diana los extremos N- y C-terminales de la proteína sin secuencias genómicas adicionales amplificadas. Se clonó el gen en el vector pFJ118EH para dar pJFptsG. Se alteró el gen mediante la inserción del casete de resistencia a kanamicina de pUC-4K
10 (Pharmacia), se cortó con EcoRI en el sitio MfeI del gen ptsG en pJFptsG para dar el plásmido pTSGK. Debido a que NZN 111 incluye ya un marcador de resistencia a kanamicina, se construyó una cepa equivalente transduciendo el gen *ldhA* inactivado con Tn10 de la cepa SE1752 en FMJ123. La cepa resultante, DC1327, era indistinguible en su fisiología de NZN 111. Se transfirió el gen ptsG alterado en
15 DC1327 transformando las células con pTSGK, haciendo crecer las células durante aproximadamente 30 generaciones en presencia de kanamicina y ausencia de ampicilina, entonces sembrando en placa el cultivo sobre placas LB que contenían glucosa e incubando de manera anaerobia. Las colonias que pudieron crecer de manera fermentativa se purificaron y se examinaron para determinar su sensibilidad a
20 los dos antibióticos, tal como se describe en detalle en los ejemplos que siguen.

Se aisló la cepa AFP400 como una cepa sensible a ampicilina, resistente a kanamicina estable, que fermentaba glucosa para dar succinato, acetato y etanol. Se confirmó la integración apropiada del gen ptsG alterado mediante PCR. Se amplificó el gen alterado a partir del ADN de AFP400 usando cebadores que se apareaban con
25 secuencias flanqueantes aproximadamente 110 pares de bases fuera de la región codificante del gen. Estas secuencias no estaban presentes en el vector de integración. El producto resultante tenía un tamaño de 3,0 kb, tal como se pronosticó a partir de la secuencia de ptsG conocida, sus regiones flanqueantes y el inserto de kanamicina. Se digirió el producto con ClaI (sitio en el casete de kanamicina) y AgeI
30 (sitio en ptsG), y se generaron los fragmentos esperados para la inserción del casete en el sitio MfeI de ptsG (1,95 y 1,05 kb para ClaI, y 2,3 y 0,7 kb para AgeI).

Aún otra cepa que comprende las tres desactivaciones, AFP 404, se deriva también de C600, una cepa K12 de *E. coli* casi de tipo natural, usando el mismo protocolo anterior.

La ubicación de las desactivaciones se conoce ya a partir de la investigación anterior de los inventores (patente estadounidense n.º 6.159.738, y Chatterjee *et al.*) tratada anteriormente. Las desactivaciones se introducen usando una copia del gen desactivado, que tiene un marcador de resistencia, para transformar células. Se deja
5 que se produzca la recombinación homóloga, tal como se facilita mediante enzimas del huésped. Entonces se selecciona el cromosoma que contiene el marcador. De este modo se introdujo la desactivación de ptsG. Se detalla la prueba de su inserción, a través de PCR, en Chatterjee, *et al.*

10 Detalle del crecimiento

Los organismos mutantes triples producidos por los inventores no son anaerobios obligados. Como tales, puede producirse la acumulación inicial de biomasa de manera aerobia, tras lo que se establecen las condiciones fermentativas. Las ventajas de este protocolo de procedimiento de dos fases (es decir, aerobia y después
15 anaerobia) se ilustran en la figura 2 en la que la tasa de producción de ácido succínico es mucho más grande en comparación con la curva de crecimiento del protocolo anaerobio de una única fase de la figura 1.

Generalmente, cuando la biomasa alcanza un punto del equivalente de aproximadamente 10^8 a 10^{11} células por mililitro (o aproximadamente de 2 a 5 gramos de peso celular seco por litro), el fermentador se hace anaerobio. En el laboratorio,
20 este punto de concentración se alcanzó tras aproximadamente seis horas.

En protocolos industriales, se carga un fermentador con agua de maceración ligera más hidrolizado lignocelulósico. Se incluyeron antibióticos según fuese necesario en las siguientes concentraciones: 100 μg de carbenicilina por ml, 30 μg de
25 kanamicina por ml, 10 μg de tetraciclina por ml y 30 μg de cloranfenicol por ml. El caldo rico contenía (por litro), 10 g de triptona, 5 g de NaCl y 1 g de extracto de levaduras. Los medios sólidos para placas contenían un 1,5 por ciento (peso/vol) de agar Bacto de Difco. Se preparó medio mínimo E tal como se describe en Vogel, H.J. 1956 Acetylornithinase in *E. coli.*, Biol. Chem. 218:97-103.

30

Las condiciones de laboratorio para la fermentación fueron las siguientes:

Se realizó el crecimiento fermentativo en tubos para suero sellados que contenían 10 ml de medio LB, complementado con 0,5 g de MgCO_3 (añadido con el fin de mantener el pH del medio durante la fermentación), antibióticos y aproximadamente

10 g/l de glucosa. Puede utilizarse una miríada de sustratos de crecimiento, incluyendo pero sin limitarse a azúcares, alcoholes de azúcar, ácidos de azúcar y combinaciones de los mismos. Se sometieron a prueba los siguientes azúcares en lugar de glucosa a una concentración de 5 g/l en crecimiento anaerobio: trehalosa, manosa, fructosa, sorbitol y ácido glucorónico.

5 Se prepararon inóculos para los cultivos líquidos anaerobios haciendo crecer las cepas de manera aerobia durante la noche en medio LB complementado con antibiótico. Se diluyó 100 veces una muestra del cultivo de durante la noche en medios frescos y se dejó crecer de manera aerobia hasta una A600 de aproximadamente 1; se inocularon los medios de crecimiento anaerobios con 1 ml de los inóculos.

10 Se extrajeron muestras de manera anóxica de los tubos sellados en momentos apropiados para el análisis de los niveles de glucosa (o sustratos de azúcar alternativos) restantes y los productos de fermentación formados. Para el crecimiento anaerobio sobre medios sólidos, se incubaron placas de agar a 37°C en una jarra anaerobia bajo una atmósfera de H₂-CO₂ generada mediante el uso de un aparato Gas-Pak.

15 Se usó un ensayo en placa para la actividad β-galactosidasa para someter a prueba la presencia de represión de catabolitos normal en cepas. El medio LB o agar E son dos de los varios medios que pueden utilizarse. El medio de agar E es un medio mínimo en nutrientes comúnmente usado, y se trata en Vogel, H.J., 1956 Acetylornithase in E. coli, J. Biol. Chem 218:97-103. En protocolos a modo de ejemplo, el medio LB o agar E se complementa con 4 g/l de glucosa, 4 g/l de lactosa, 3 mg/l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosida (X-gal) y antibióticos. A continuación en el presente documento estos medios se denominan agar X-gal/glucosa. La formación de colonias azules indicaba la expresión de β-galactosidasa en presencia de glucosa debido a la ausencia de represión de catabolitos normal. A la inversa, la formación de colonias blancas indicaba que existía represión de catabolitos normal, y por tanto no estaba presente ninguna enzima para escindir el disacárido lactosa.

20 Se usó un ensayo en placa para la actividad β-galactosidasa para someter a prueba la presencia de represión de catabolitos normal en cepas. El medio LB o agar E son dos de los varios medios que pueden utilizarse. El medio de agar E es un medio mínimo en nutrientes comúnmente usado, y se trata en Vogel, H.J., 1956 Acetylornithase in E. coli, J. Biol. Chem 218:97-103. En protocolos a modo de ejemplo, el medio LB o agar E se complementa con 4 g/l de glucosa, 4 g/l de lactosa, 3 mg/l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosida (X-gal) y antibióticos. A continuación en el presente documento estos medios se denominan agar X-gal/glucosa. La formación de colonias azules indicaba la expresión de β-galactosidasa en presencia de glucosa debido a la ausencia de represión de catabolitos normal. A la inversa, la formación de colonias blancas indicaba que existía represión de catabolitos normal, y por tanto no estaba presente ninguna enzima para escindir el disacárido lactosa.

25 Los inventores también han ideado un método para utilizar el mutante en un proceso continuo. En este proceso continuo, se llevaron a cabo experimentos repetitivos en los que tras haber producido el cultivo aproximadamente 50 g/l de ácido succínico, se añadió un mililitro de la mezcla a un recinto nuevo que contenía medios LB, glucosa y MgCO₃. Este nuevo inóculo continuó produciendo ácido succínico

eficazmente. Se repitió este proceso 3-4 veces, dando como resultado en cada caso una producción eficaz de ácido succínico.

Ejemplo 1. Producción de ácido succínico utilizando hidrolizado industrial

5 Se colocó AFP 184 en un fermentador con hidrolizado verdadero, de paja de arroz. Un hidrolizado a modo de ejemplo es el preparado comercialmente y puesto a disposición por Arkenol Inc., de Mission Viejo, CA, a través de su procedimiento de hidrólisis con ácido concentrado. El medio de paja de arroz contiene aproximadamente 600 g/l de glucosa y 169 g/l de xilosa como los dos componentes de azúcar principales, más cantidades menores de otros azúcares. Los datos experimentales se encuentran en la tabla 2 y en la figura 2.

 El siguiente es un protocolo del proceso de fermentación a base de AFP 184: El medio de fermentación contenía los siguientes componentes: extracto de levadura de Difco 5 g/l, triptona 10 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, NaCl 10 g/l, K_2HPO_4 7 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, hidrolizado de Arkenol 16,5 mg/l y kanamicina 30 mg/l. El hidrolizado industrial contenía 607 g/l de glucosa y 169 g/l de xilosa como los dos componentes de azúcar principales más cantidades menores de otros azúcares. Se esterilizó en autoclave el medio con todos los componentes excepto el antibiótico a 121°C durante 20 minutos. Entonces se añadió kanamicina tras el enfriamiento. Se usó este medio de fermentación tanto para los matraces de inóculo como para el fermentador de un litro. Para el inóculo, se colocaron 50 mg de medio en un matraz de 250 mg y se inoculó con 0,2 mg del cultivo de reserva de AFP184 que se mantuvo en glicerol al 30% y a -70°C. Se incubó el matraz en un agitador incubador a 37°C y 250 rpm durante la noche (aproximadamente 16 horas). Entonces se usó todo el contenido del matraz para inocular el fermentador que se mantuvo a 37°C. Se aireó el medio en el fermentador para permitir el crecimiento rápido del organismo. Tras seis horas, cuando se logró la masa celular requerida, se emprendieron las siguientes acciones: 1. se apagó el aire para producir condiciones anaeróbicas, que iniciarían la producción de ácido succínico; 2. se inyectó gas de dióxido de carbono en el medio a una velocidad de 0,03 mg por minuto; y 3. se añadió una disolución de alimentación que contenía el hidrolizado de Arkenol diluido con agua desionizada hasta una concentración de 500 g/l de glucosa total más xilosa al fermentador para lograr una concentración de azúcar total de 50 g/l en el medio de fermentación. Durante el transcurso del experimento, cuando la concentración de azúcar en el fermentador era

baja, se añadió más alimento para proporcionar sustratos suficientes para la producción de ácido succínico. A medida que las células producían ácido succínico, bajaba el pH. Se mantuvo a pH 6,5 mediante la adición de una disolución de Na_2CO_3 1,5 M a través de la acción de un controlador de pH automático. Se tomaron muestras a intervalos y se analizaron para determinar la densidad óptica, la glucosa, la xilosa, el ácido succínico, el ácido acético, el ácido láctico y el etanol.

Tabla 2: Producción de ácido succínico, ácido acético y etanol a partir de Arkenol con un mutante que contiene anomalías de ptsG, ldh y pfl

Tiempo	Glucosa	Xilosa	Ácido succínico	Ácido acético	Etanol
0	7,04	1,94	0	0	1,60
2	6,85	1,53	0	0,41	1,35
4,2	4,41	0	0	0,85	1,13
6	0	0	0	0,55	1,04
6,05	29,27	7,17	0	0	0,68
24	9,56	1,69	26,12	2,24	0,49
24,05	27,25	5,60	26,39	2,82	0,72
28,1	23,7	14,69	28,42	2,98	0,71
29,5	22,8	14,17	27,20	3,04	0,67
29,55	34,77	7,95	26,41	2,63	0,52
48	20,98	4,72	37,98	3,71	0,62
54	19,13	4,30	43,82	4,10	0,71
54,05	46,73	10,85	43,51	3,69	0,59
72	35,14	8,85	48,52	4,01	0,63
80	33,60	8,45	51,44	4,10	0,50
104,25	23,02	7,20	50,99	4,64	0
120	19,73	6,77	54,12	4,83	0
192	13,04	5,87	63,21	4,88	0

10

Ejemplo 2. Producción de ácido succínico a partir de mezcla de azúcar sintética

Se desarrolló un protocolo de fermentación utilizando AFP 184 en combinación con una materia prima de azúcar sintética. Como puede observarse en la figura 3, la producción de succinato era rápida hasta 80 horas, y se alcanzó una meseta un poco antes de alcanzar un pico final de 60 g/l tras aproximadamente 140 horas.

15

El medio de fermentación contenía los siguientes componentes: extracto de levadura de Difco 5 g/l, triptona 10 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, NaCl 10 g/l, K_2HPO_4 7 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, glucosa 7,6 g/l, xilosa 1,85 g/l y kanamicina 30 mg/l. Se esterilizó en autoclave el medio con todos los componentes excepto el antibiótico a 121°C durante 20 minutos. Entonces se añadió kanamicina tras el enfriamiento. Se usó este medio de fermentación tanto para los matraces de inóculo como para el

20

fermentador de un litro. Para el inóculo, se colocaron 50 mg de medio en un matraz de 250 mg y se inoculó con 0,2 mg del cultivo de reserva de AFP184 que se mantuvo en glicerol al 30% y a -70°C. Se incubó el matraz en un agitador incubador a 37°C y 250 rpm durante la noche (aproximadamente 16 horas). Entonces se usó todo el contenido del matraz para inocular el fermentador que se mantuvo a 37°C.

Se aireó el medio en el fermentador para permitir el crecimiento rápido del organismo. Tras seis horas, cuando se logró la masa celular requerida, se emprendieron las siguientes acciones:

1. se apagó el aire para producir condiciones anaeróbicas, que iniciarían la producción de ácido succínico;
2. se inyectó gas de dióxido de carbono en el medio a una velocidad de 0,03 mg por minuto; y
3. se añadió una disolución de alimentación que contenía 400 g/l de glucosa y 84 g/l de xilosa al fermentador para lograr una concentración de azúcar total de 50 g/l en el medio de fermentación.

Durante el transcurso del experimento, cuando la concentración de azúcar en el fermentador era baja, se añadió más alimento para proporcionar sustratos suficientes para la producción de ácido succínico. A medida que las células producían ácido succínico, bajaba el pH. Se mantuvo a pH 6,5 mediante la adición de una disolución de Na_2CO_3 1,5 M a través de la acción de un controlador de pH automático. Se tomaron las muestras a intervalos y se analizaron para determinar la densidad óptica, la glucosa, la xilosa, el ácido succínico, el ácido acético, el ácido láctico y el etanol.

La tabla 3, a continuación, y la figura 3 ilustran la producción de ácido succínico que resulta de la utilización de la mezcla de azúcar sintética.

Como puede observarse en una comparación entre el ejemplo 1 y el ejemplo 2, la producción de succinato del mutante era equivalente (véanse los puntos de tiempo 120 y 122 de las tablas 2 y 3, respectivamente) cuando se usó el hidrolizado industrial frente a cuando se usó la materia prima sintética. Este resultado ilustra el carácter robusto del protocolo inventado porque cualquier material tóxico inherente con hidrolizados de calidad industrial no degradaron el rendimiento.

Tabla 3: Producción de ácido succínico en un protocolo de fermentación utilizando azúcar sintética

Tiempo	Glucosa	Xilosa	Succinato	Acetato
0	7,65	1,85	0	0
2	7,19	1,03	0	0,32
4,2	3,15	0	0	1,1
4,45	6,03	0,84	0	1,1
6	1,04	0	0	2,02
6,25	40,2	7,57	0	2,02
24	7,76	3,92	24,55	3,43
30	9,18	2,63	29,34	4,11
30,25	39,3	8,2	29,34	4,11
Tiempo	Glucosa	Xilosa	Succinato	Acetato
48	18,6	5,5	39,8	4,6
54	14,8	4,95	42,33	5,26
54,25	27,4	8,1	40,77	4,9
72	19,7	6,04	48,33	5,76
78	17,6	5,42	50,27	6
78,25	35,5	9,49	48,87	5,75
96,5	30,2	8,25	53,62	5,87
122	24,1	6,48	55,1	5,87
144	22,8	5,67	59,35	5,43

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de ácido succínico a partir de hidrolizados de calidad industrial que comprende :
 - 5 a) suministrar un organismo de una cepa de *Escherichia coli* seleccionada de AFP 184 (ATCC PTA 5132), AFP 400 (ATCC PTA 5583) y AFP 404 (ATCC PTA 5133);
 - b) permitir que dicho organismo acumule biomasa; y
 - c) permitir que dicho organismo metabolice el hidrolizado.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la biomasa acumula entre aproximadamente 10^8 y 10^{11} células por mililitro.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el hidrolizado de calidad industrial es hidrolizado lignocelulósico, o disoluciones de azúcar derivada de maíz.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la temperatura se selecciona de entre aproximadamente 25°C y 45°C.
- 15 5. Método según la reivindicación 1, en el que la biomasa se acumula en una atmósfera aerobia.
6. Método según la reivindicación, en el que el pH se selecciona de entre aproximadamente 5 y 9.
- 20 7. Método según la reivindicación 1, en el que el hidrolizado está contenido en una primera cantidad de materias primas y en el que el método se hace continuo con la adición de una segunda cantidad de materias primas.
8. Método según la reivindicación 7, en el que se añade la segunda cantidad de materias primas cuando la concentración de ácido succínico es de aproximadamente 50 g/l.
- 25 9. Cepa mutante de *Escherichia coli* seleccionada de AFP 184 (ATCC PTA 5132), AFP 400 (ATCC PTA 5583) y AFP 404 (ATCC PTA 5133), caracterizada porque produce ácido succínico a partir de sustrato contenido en hidrolizado de calidad industrial en una razón de entre 0,6:1 y 1,3:1 de ácido succínico con respecto al sustrato.
- 30 10. Mutante según la reivindicación 9, en el que el sustrato es un azúcar seleccionado del grupo que consiste en glucosa, lactosa, sorbitol, xilosa, arabinosa, manosa, ácido glucorónico, galactosa, fructosa o combinaciones de los mismos.

11. Mutante según la reivindicación 9, en el que el mutante puede utilizar más de un sustrato simultáneamente para producir ácido succínico simultáneamente.

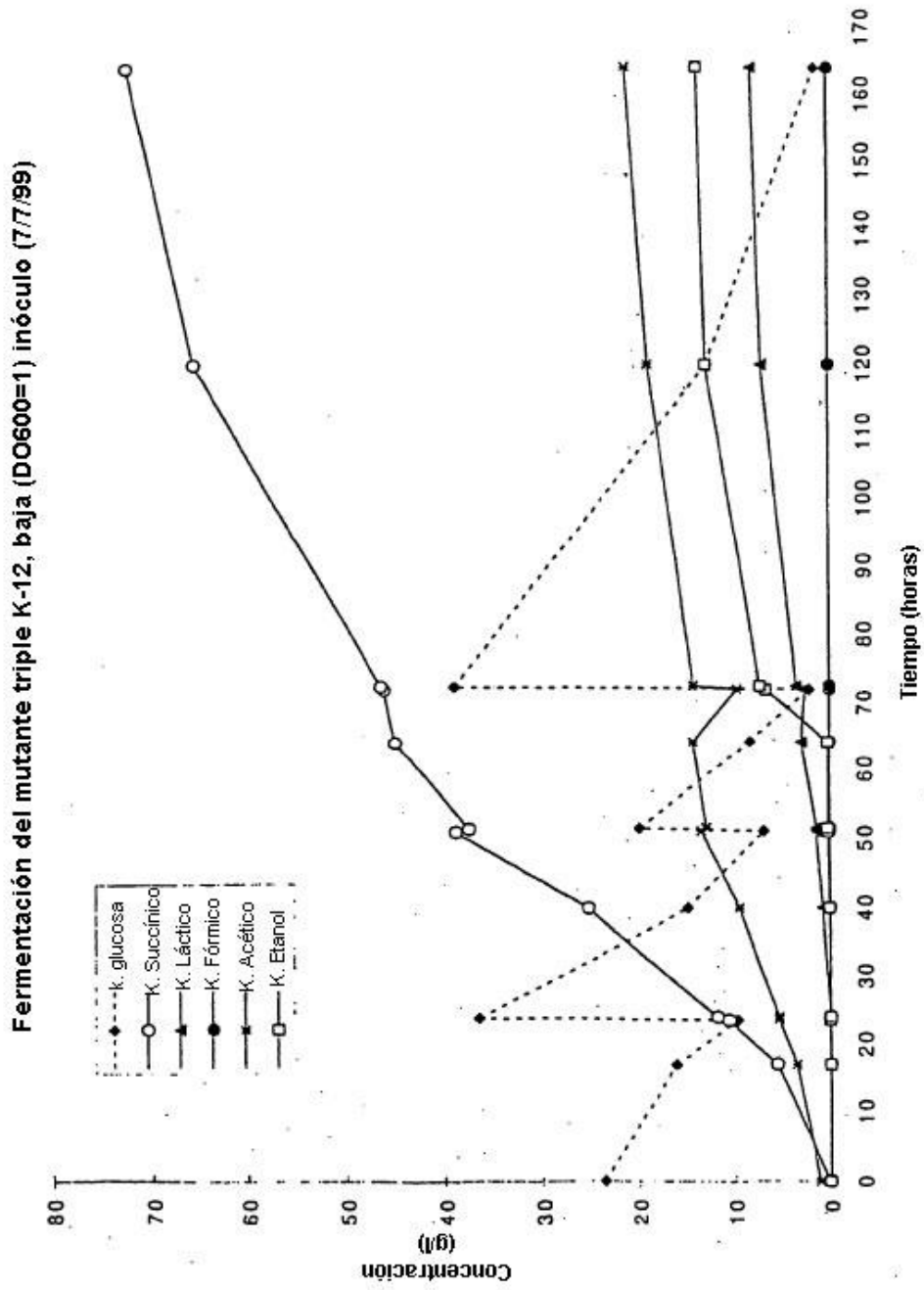


FIG I

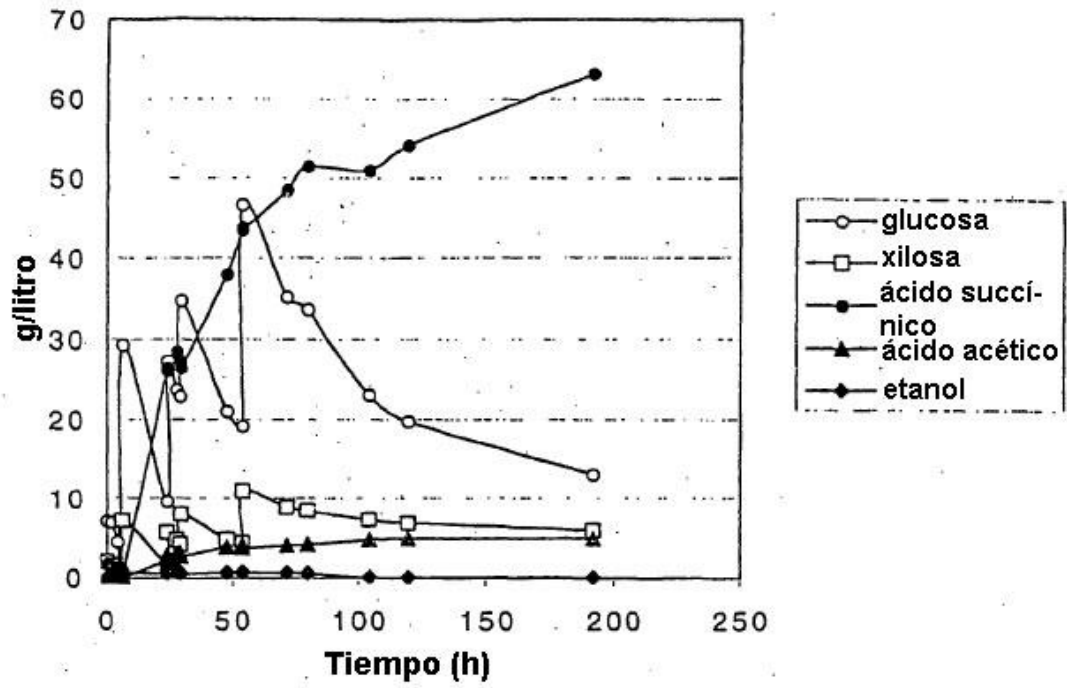


FIG 2

Producción de ácido succínico a partir de mezcla de glucosa y xilosa sintética por AFP 184

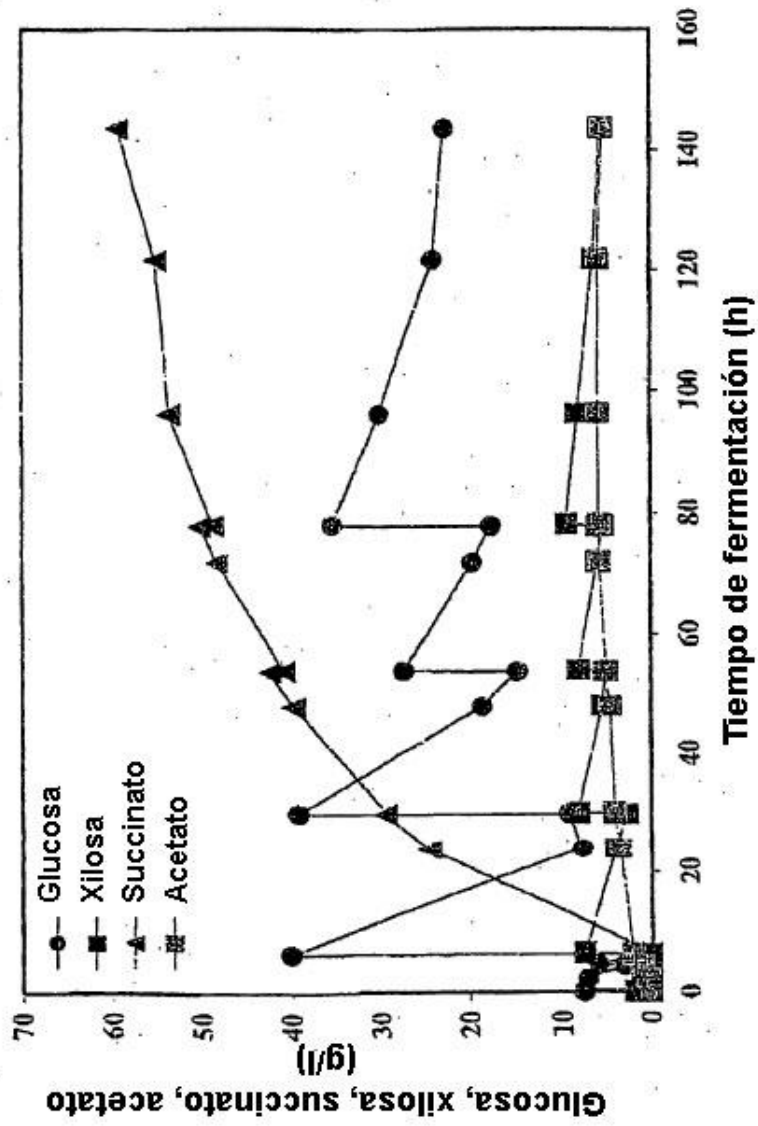


FIG 3