

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 859 490**

51 Int. Cl.:

**C12R 1/46** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 15/01** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2017 PCT/EP2017/068117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018 WO18019656**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2017 E 17793839 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020 EP 3488020**

54 Título: **Cepa bacteriana productora de 2,3-butanodiol y otros metabolitos**

30 Prioridad:

**19.07.2016 EP 16382347**

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

**04.10.2021**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN TECNALIA RESEARCH &  
INNOVATION (100.0%)**

**Parque Científico y Tecnológico de Gipuzkoa,  
Paseo de Mikeletegi Pasealekua, 2  
20009 Donostia-San Sebastian, Guipuzcoa, ES**

72 Inventor/es:

**RONCAL MARTÍNEZ, TOMÁS;  
CABALLERO ROMÁN, SUSANA;  
DÍAZ DE GUEREÑU ZABARTE, MARÍA DEL MAR;  
RINCÓN ARROYO, INÉS;  
PRIETO FERNÁNDEZ, SORAYA y  
OCHOA GÓMEZ, JOSÉ RAMÓN**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

ES 2 859 490 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Cepa bacteriana productora de 2,3-butanodiol y otros metabolitos

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP16382347.9 presentada el 19 de julio de 2016.

**Campo de la técnica**

- 10 La presente invención se encuadra dentro del campo de los microorganismos obtenidos mediante manipulación genética. En concreto, la presente invención se refiere a una cepa de *Lactococcus lactis lactis*, caracterizada por una elevada capacidad de producción de 2,3-butanodiol y acetoína, moléculas que tienen variadas aplicaciones en la industria química, farmacéutica y de biocombustibles.

**Estado de la técnica**

- 15 El 2,3-butanodiol (2,3-BDO) es un compuesto que presenta un gran interés potencial en los campos de los combustibles y productos químicos, incluyendo usos como materia prima de partida para la síntesis de un amplio rango de productos químicos (*building block*). Se puede utilizar como disolvente, agente anticongelante, combustible líquido y monómero para la fabricación de numerosos polímeros y resinas sintéticos. Posee un poder calorífico de  $27.200 \text{ J g}^{-1}$ , similar a los del etanol ( $29.100 \text{ J g}^{-1}$ ) y metanol ( $22.100 \text{ J g}^{-1}$ ), lo que haría de él apto como combustible
- 20 líquido y como aditivo para combustibles. Además, por su elevado número de octano, podría servir como elevador de octanaje para la gasolina. El 2,3-BDO encuentra también potenciales aplicaciones adicionales en la producción de tintas de impresión, perfumes, insecticidas, spandex, agentes humectantes y suavizantes, plastificantes y como vehículo para productos farmacéuticos.
- 25 Son de especial relevancia los usos del 2,3-BDO como *building block*, es decir, como precursor en la síntesis de valiosos productos químicos industriales, incluyendo acetoína y diacetilo, metil etil cetona, 2-butanol, butenos, 1,3-butadieno y plásticos (poliésteres, policarbonatos y poliuretanos). Entre ellos, el 1,3-butadieno merece una especial atención ya que es el monómero para la síntesis del caucho sintético, empleado principalmente en la fabricación de neumáticos. Además, algunos de los derivados arriba indicados pueden ser convertidos, por medio de reacciones de
- 30 oligomerización, condensación e hidrogenación, en hidrocarburos superiores con usos potenciales como (bio)combustibles, incluyendo los combustibles para aviación.

Desde el punto de vista comercial, los derivados clave del 2,3-BDO poseen un mercado potencial global de alrededor de 32 millones de toneladas anuales, con un valor de venta de aproximadamente 43.000 millones de dólares.

- 35 En la actualidad, la producción industrial de 2,3-BDO se realiza principalmente a partir de materias primas petroquímicas, a través de un complejo y costoso proceso. Durante el proceso de refinado del petróleo, tras la retirada del butadieno y el isobuteno de los gases de cracking, se obtiene una fracción de hidrocarburos C4, denominada C4 refinado 2, que contiene aproximadamente un 77% de butenos y un 23% de una mezcla de butano e isobutano.
- 40 Mediante clorohidrinación de esta fracción con una solución de cloro en agua y la subsiguiente ciclación de las clorohidrinadas resultantes con hidróxido de sodio, se obtiene una mezcla de óxidos de buteno con la siguiente composición: 85% de óxido de 2,3-buteno y 15% de óxido de 1,2-buteno. La hidrólisis de esta mezcla a 160-220 °C bajo 50 bar de presión da lugar a una mezcla de butanodiolos que es separada mediante destilación fraccionada a vacío.

- 45 El 2,3-BDO constituye actualmente un segmento del mercado poco atractivo a causa de su costosa síntesis química. El precio de las materias primas y el impacto en el medio ambiente de utilizar 2,3-BDO sintético son las principales barreras para el crecimiento del mercado global del 2,3-BDO. A causa de estos problemas, las tendencias se están desplazando hacia la búsqueda de alternativas más respetuosas con el medio ambiente y más económicamente rentables y competitivas y, entre ellas, la producción biológica de 2,3-BDO figura en un lugar destacado
- 50 (<http://www.transparencymarketresearch.com>; Butanediol (1,4 BDO & 2,3 BDO), 1,3 Butadiene and MEK Market: Applications (THF, PU, PBT, SBR, ABS, NBR etc.), Bio-based Alternatives, Downstream Potential, Market Size and Forecast, 2010 – 2018).

- 55 Es un hecho conocido que numerosos microorganismos poseen la capacidad de producir 2,3-BDO como resultado de su actividad metabólica. Sin embargo, tan sólo unos pocos de ellos producen este compuesto en cantidades suficientemente elevadas para ser potencialmente considerados como relevantes desde un punto de vista industrial. Los mejores productores son bacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Serratia*, especialmente *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.

- 60 La ruta metabólica implicada en la biosíntesis de 2,3-BDO se inicia en el piruvato resultante del metabolismo de los azúcares y comprende tres pasos. En el primer paso, la enzima tiamina-dependiente  $\alpha$ -acetolactato sintasa cataliza la condensación de dos moléculas de piruvato dando como resultado una molécula de  $\alpha$ -acetolactato y liberando una

molécula de CO<sub>2</sub>. El  $\alpha$ -acetolactato es convertido entonces en acetoina por medio de una reacción de descarboxilación catalizada por la enzima  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa. Finalmente, la acetoina es reducida a 2,3-BDO por la enzima acetoina reductasa/2,3-BDO deshidrogenasa, utilizando NADH como cofactor.

5 En relación a una potencial producción de 2,3-BDO mediante fermentación, el hecho de que los mejores productores descritos, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, sean bacterias patógenas pertenecientes al Grupo de Riesgo 2 (GR-2) supone una gran preocupación. Los procesos de fermentación a escala industrial requieren el cumplimiento de estrictas medidas de seguridad, lo que implica que la utilización de agentes biológicos del GR-2 es un fuerte obstáculo para el desarrollo de los mismos. Cuando se realizan fermentaciones mayores de 10 L utilizando microorganismos del GR-2  
10 se deben adoptar las medidas necesarias de bioseguridad, incluyendo el diseño de instalaciones de contención de Nivel de Bioseguridad 2 a gran escala (*Biosafety Level 2 Large Scale* – BSL2-LS) y procedimientos operativos especiales. Estas medidas de bioseguridad incrementan significativamente los costes de producción, que se ha estimado que aumentarían en un 10-30%, considerando únicamente los costes básicos del fermentador, por cada incremento en el nivel de contención.

15 Por lo tanto, existe la necesidad de disponer de microorganismos del Grupo de Riesgo 1 (GR-1), es decir, microorganismos seguros o sin riesgo biológico, capaces de producir 2,3-BDO de un modo tan eficiente como las anteriormente indicadas bacterias del GR-2. Varias bacterias pertenecientes al GR-1 han sido descritas como productoras naturales de 2,3-BDO, pero, en general, su eficiencia es demasiado baja para un proceso  
20 económicamente rentable.

Como alternativa, se ha construido mediante ingeniería genética una cepa productora de 2,3-BDO de la bacteria *Escherichia coli*, bacteria que no produce este metabolito de forma natural y que ha requerido la construcción e introducción en ella de la ruta biosintética completa (Nielsen, D.R., Yoon S.H., Yuan, C.J., and Prather, K.J., "Metabolic  
25 Engineering of Acetoin and meso-2,3-Butanediol Biosynthesis in *E. coli*.", *Biotechnol. J.*, 2010, Vol. 5, pp. 274-284). Otra posibilidad a considerar es el uso de microorganismos productores naturales de 2,3-BDO pertenecientes al GR-1 a los que mejorar sus capacidades de síntesis de este compuesto. Dentro de esta última alternativa, la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* aparece como un posible candidato.

30 *L. lactis* muestra varias características beneficiosas para el desarrollo de procesos industriales: posee un genoma de pequeño tamaño y bien caracterizado, que ha sido secuenciado en diversas cepas; se encuentra disponible una amplia variedad de herramientas para su manipulación genética; muestra un rápido crecimiento bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas; presenta un elevado flujo glicolítico; posee un metabolismo energético y del carbono bastante simple; cuenta con diferentes rutas metabólicas para la producción de productos químicos interesantes; no  
35 es un patógeno y es considerado un organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe* – Generalmente Considerado como Seguro), lo que le permite ser empleado en aplicaciones alimentarias.

*L. lactis* es una bacteria anaerobia facultativa caracterizada por producir ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos (fermentación homoláctica). Bajo condiciones particulares, sin embargo, esta bacteria  
40 puede también realizar una fermentación heteroláctica o ácido-mixta, produciendo un perfil de metabolitos diferente, incluyendo 2,3-BDO. Con todo, aunque *L. lactis* contiene la ruta metabólica de síntesis de 2,3-BDO completa, la producción natural de este metabolito es residual.

Existen unos pocos estudios que describen el uso de técnicas de ingeniería metabólica para incrementar la producción de 2,3-BDO en *L. lactis* (Platteeuw C, Hugenholtz J, Starrenburg M, van Alen-Boerrigter I, de Vos WM, "Metabolic  
45 engineering of *Lactococcus lactis* — influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate-dehydrogenase as a function of culture conditions", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, Vol. 61, pp. 3967–71; Gaspar P, Neves AR, Gasson MJ, Shearman CA, Santos H, "High yields of 2,3-butanediol and mannitol in *Lactococcus lactis* through engineering of NAD(+) cofactor recycling", *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, Vol. 77, pp. 6826–35; Liu J, Chan SHJ, Brock-Nannestad T, Chen J, Lee SY, Solem C, Jensen PR, "Combining metabolic engineering and biocompatible chemistry for high-yield production of homo-diacetyl and homo-(S,S)-2,3-butanediol", *Metabolic  
50 engineering*, 2016, Vol. 36, pp. 57–67) y otras bacterias ácido lácticas (Enhanced pyruvate to 2,3-butanediol conversion in lactic acid bacteria, PCT/US2009/058834). Todos ellos se basan, por un lado, en la inactivación de rutas metabólicas competidoras, especialmente la de síntesis de ácido láctico, y, por otro lado, en la sobreexpresión de los genes de la  
55 ruta de síntesis de 2,3-BDO.

La producción de 2,3-BDO por estas cepas recombinantes requiere su cultivo en medios que contengan antibióticos, para mantener el material genético exógeno introducido en ellas, y/o compuestos como la nisina, para inducir una expresión génica aumentada, o la hemina y el Fe<sup>3+</sup>, para sustentar el crecimiento. En cualquier caso, los medios de  
60 cultivo deben ser suplementados con costosos ingredientes que incrementan los costes hasta niveles difícilmente compatibles con los de un proceso industrial económicamente eficiente.

En vista de lo anterior existe todavía la necesidad de desarrollar cepas de *L. lactis* alternativas a las existentes que sean útiles en la producción, eficiente y segura de 2,3-BDO.

#### Descripción detallada de la invención

5

Con el fin de solucionar esta carencia, la presente invención proporciona una cepa RG1 de *Lactococcus lactis* identificada como *Lactococcus lactis* 43103, con una capacidad mejorada para producir 2,3-BDO, y un método de fermentación eficiente utilizando dicha cepa, con altos rendimientos y productividades, y factible industrialmente. Además, sorprendentemente, se ha encontrado que esta misma cepa produce otros metabolitos alternativos, especialmente acetoina y ácido láctico, dependiendo de las condiciones de cultivo utilizadas.

10

La cepa de *L. lactis* de la invención fue depositada, según los requisitos del Tratado de Budapest, el 19 de abril de 2016 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), ubicada en la Universidad de Valencia C.P 46980 Catedrático Agustín Escardino, num. 9, Paterna, Valencia (España), por el depositante Fundación Tecnalia Research & Innovation, ubicado en el Parque Tecnológico de San Sebastián, Mikeletegi Pasealekua, num. 2, E-20009 Donostia-San Sebastián (España). La cepa de *L. lactis* fue identificada por el depositante con la referencia 43103, y recibió el número de acceso CECT 9139, y fue, además, declarada como viable. Su nombre es específicamente *L. lactis* 43103.

15

La presente invención proporciona una cepa bacteriana de *L. lactis* 43103, perteneciente a la clase GR-1, que muestra una elevada capacidad de producción de metabolitos como el 2,3-BDO, la acetoina y el ácido láctico, dependiendo de las condiciones en que se realiza su cultivo. La cepa muestra una versatilidad sorprendente en cuanto a la producción de los diferentes metabolitos sin que por ello se vea afectada su viabilidad y funcionalidad.

20

Tal y como se ilustra más abajo, la cepa de la invención muestra ser altamente eficiente y específica en la producción de los diferentes metabolitos mencionados, dependiendo de las condiciones del medio. Así, utilizando la cepa para fermentar un medio de cultivo rico en carbohidratos, y simplemente ajustando los parámetros de pH y oxígeno, la cepa de la invención es capaz de producir mayoritariamente 2,3-BDO, acetoina o ácido láctico. Es importante remarcar que estas características se consiguen sin la necesidad de suplementar el medio de cultivo con compuestos como antibióticos, nisina u otros que promuevan la síntesis de los productos mencionados. Este último punto es crucial, ya que abarata el coste de producción y simplifica los pasos de manipulación y fermentación del procedimiento. En definitiva, hace más fácil la obtención de los metabolitos a escala industrial.

25

30

Para llegar a la cepa de la invención, los inventores han explotado un procedimiento que comprende la fusión de los protoplastos de dos cepas de *L. lactis* modificadas genéticamente. Este procedimiento se conoce como "genome shuffling", y permite la recombinación genética de dos mutantes (Zhang YX, Perry K, Vinci VA, Powell K, Stemmer WP, del Cardayré SB, "Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria", Nature, 2002, Vol. 415, pp. 644–646). Sorprendentemente, por medio de la fusión de protoplastos, se ha hallado la nueva cepa de *L. lactis* 43103, con una elevada capacidad de producción de metabolitos. Ventajosamente, haciendo uso de la técnica de fusión de protoplastos no se requiere la introducción dentro de la bacteria de secuencias de ADN exógeno ni el uso de inductores químicos de la expresión génica.

35

40

Así, también se describe un procedimiento de producción de una cepa modificada de *L. lactis* que comprende una etapa de fusión de los protoplastos de dos cepas parentales de *L. lactis* las cuales, comparadas con una cepa de *L. lactis* silvestre, tienen: (a) una capacidad incrementada de producción de acetoina y/o 2,3-butanodiol, y (b) una capacidad reducida de producción de ácido láctico, cuando se cultivan en condiciones aeróbicas.

45

Como revelan los datos experimentales aportados, la cepa resultante de este procedimiento puede mostrar, según las condiciones de cultivo, una elevada capacidad de producción de 2,3-BDO y, por el contrario, una reducida capacidad de producción de ácido láctico, en comparación a las cepas de las que procede.

50

En la presente descripción, cada una de dichas cepas de *L. lactis* parentales con capacidad incrementada de producción de acetoina y/o 2,3-butanodiol, y capacidad reducida de producción de ácido láctico cuando se cultivan en condiciones aeróbicas, se obtiene sometiendo a mutagénesis una cepa silvestre de *L. lactis*.

55

En un ejemplo, el tratamiento de mutagénesis es al azar.

En otro ejemplo particular, el tratamiento de mutagénesis es un tratamiento químico.

En otro ejemplo particular, el tratamiento de mutagénesis se lleva a cabo con metanosulfonato de etilo.

60

En otro ejemplo particular, el tratamiento de mutagénesis es un tratamiento basado en radiación.

En otro ejemplo particular, la mutagénesis se realiza mediante técnicas recombinantes de ingeniería genética.

En un ejemplo particular de la presente descripción, las cepas resultantes del procedimiento se seleccionan de un medio nutritivo sólido, de pH ácido, baja capacidad de tamponamiento y suplementado con 2,3,5-trifenil tetrazolio (tal como se describe en las patentes FR2777905 y ES2352633B1). Las bacterias altamente productoras de ácido láctico crecen en este medio de selección formando colonias rosadas, mientras que las bacterias con reducida capacidad de producción de ácido láctico forman colonias de coloración roja/marrón.

En otro ejemplo particular de la presente divulgación, una de las cepas parentales tiene una capacidad incrementada de producción de acetoina y la otra cepa tiene una capacidad incrementada de producción de 2,3-butanodiol, ambas con respecto a la cepa de tipo silvestre, cuando se cultivan en condiciones aeróbicas.

En otro ejemplo particular de la presente divulgación, la cepa de tipo silvestre de partida, sobre la que se realiza el tratamiento de mutagénesis, es la cepa *Lactococcus lactis* NCIMB 702118, depositada en la National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria del Reino Unido.

En otro ejemplo particular de la presente divulgación, una de las dos cepas parentales sometidas a la etapa de fusión de protoplastos es la cepa *Lactococcus lactis* CML B4, que tiene capacidad incrementada de producción de acetoina y reducida de ácido láctico cuando se cultiva en condiciones aeróbicas, con respecto a una cepa silvestre de *Lactococcus lactis*. La cepa *Lactococcus lactis* CML B4 fue depositada por el solicitante, de acuerdo con el Tratado de Budapest, el 21 de abril de 2009 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en la Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjasot (Valencia) España. Esta cepa de *L. lactis* fue identificada por el depositante con la referencia *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CML B4, y recibió el número de acceso CECT 7512, y fue, además, declarada como viable.

En otro ejemplo particular de la presente divulgación, una de las dos cepas parentales sometidas a la etapa de fusión de protoplastos es la cepa *Lactococcus lactis* CML B3, que tiene capacidad incrementada de producción de 2,3-butanodiol y acetoina y reducida de ácido láctico, cuando se cultiva en condiciones aeróbicas, con respecto a una cepa silvestre de *Lactococcus lactis*,

En otro ejemplo particular de la presente divulgación, la cepa parental con capacidad incrementada de producción de acetoina y reducida de ácido láctico, en condiciones de cultivo aeróbicas, que se utiliza en la etapa de fusión de protoplastos, es la cepa *Lactococcus lactis* CML B4, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de registro CECT 7512, y la cepa parental con capacidad incrementada de producción de 2,3-butanodiol y reducida de ácido láctico, en condiciones de cultivo aeróbicas, que se utiliza en la etapa de fusión de protoplastos es la cepa *Lactococcus lactis* CML B3.

En otro ejemplo particular de la presente divulgación, la cepa parental con capacidad incrementada de producción de acetoina y reducida de ácido láctico, en condiciones de cultivo aeróbicas, que se utiliza en la etapa de fusión de protoplastos, es la cepa *Lactococcus lactis* CML B4, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de registro CECT 7512, y la cepa parental con capacidad incrementada de producción de 2,3-butanodiol y reducida de ácido láctico, en condiciones de cultivo aeróbicas, que se utiliza en la etapa de fusión de protoplastos es la cepa *Lactococcus lactis* CML B3, siendo las cepas CML B4 y CML B3 derivadas de la cepa NCIMB 702118.

En otro ejemplo, el procedimiento comprende las siguientes etapas: 1) Se somete a una cepa silvestre de *L. lactis* a mutagénesis; 2) Se seleccionan dos cepas parentales producidas en la etapa 1), en donde las dos cepas parentales de *L. lactis* tienen, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de acetoina y/o 2,3-butanodiol y una capacidad reducida de producción de ácido láctico con respecto a la cepa silvestre; 3) se somete a las dos cepas parentales seleccionadas en la etapa 2) a una etapa de fusión de protoplastos.

En otro ejemplo, el procedimiento comprende las siguientes etapas: 1) Se somete a la cepa silvestre de *Lactococcus lactis* NCIMB 702118 a mutagénesis; 2) Se seleccionan dos cepas parentales producidas en la etapa 1), en donde las dos cepas parentales de *L. lactis* tienen, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de acetoina y/o 2,3- butanodiol y una capacidad reducida de producción de ácido láctico con respecto a la cepa silvestre; 3) se somete a las dos cepas parentales seleccionadas en la etapa 2) a una etapa de fusión de protoplastos.

En otro ejemplo, el procedimiento comprende las siguientes etapas: 1) Se somete a la cepa silvestre de *Lactococcus lactis* NCIMB 702118 a mutagénesis química mediante la exposición al metanosulfonato de etilo; 2) Se seleccionan dos cepas parentales producidas en la etapa 1), en donde las dos cepas parentales de *L. lactis* tienen, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de acetoina y/o 2,3- butanodiol y una capacidad reducida de producción de ácido láctico con respecto a la cepa silvestre; 3) se somete a las dos cepas seleccionadas en la etapa 2) a una etapa de fusión de protoplastos.

En otro ejemplo, el procedimiento comprende las siguientes etapas: 1) Se somete a la cepa silvestre de *Lactococcus lactis* NCIMB 702118 a mutagénesis química mediante la exposición al metanosulfonato de etilo; 2) Se seleccionan dos cepas parentales producidas en la etapa 1), en donde una de las cepas de *L. lactis* tiene capacidad incrementada de producción de acetoina y una capacidad reducida de producción de ácido láctico y la otra tiene una capacidad incrementada de producción de 2,3-butanodiol y una capacidad reducida de producción de ácido láctico, cuando se cultivan en condiciones aeróbicas, respecto a la cepa silvestre; 3) se somete a las dos cepas parentales seleccionadas en la etapa 2) a una etapa de fusión de protoplastos.

También se describe una cepa de la bacteria *L. lactis* modificada obtenible mediante el procedimiento descrito arriba.

En un ejemplo particular de la presente divulgación, la bacteria posee, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de 2,3 butanodiol de como mínimo 10 veces con respecto a la cepa silvestre.

En otro ejemplo, la bacteria posee, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de 2,3 butanodiol de como mínimo 20 veces con respecto a la cepa silvestre.

En otro ejemplo, la bacteria posee, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de acetoina de como mínimo 10 veces con respecto a la cepa silvestre.

En otro ejemplo, la bacteria posee, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de acetoina de como mínimo 20 veces con respecto a la cepa silvestre.

En otro ejemplo, la bacteria posee, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad reducida de producción de ácido láctico de cómo mínimo 10 veces con respecto a la cepa silvestre.

En otro ejemplo, la bacteria posee, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad reducida de producción de ácido láctico de cómo mínimo 20 veces con respecto a la cepa silvestre.

En otro ejemplo, la bacteria posee, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de 2,3 butanodiol de cómo mínimo 10 veces con respecto a la cepa silvestre de la procede, y posee una capacidad reducida de producción de ácido láctico de cómo mínimo 10 veces con respecto a la cepa silvestre.

En otro ejemplo, la bacteria posee, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de 2,3 butanodiol de cómo mínimo 20 veces con respecto a la cepa silvestre de la procede, y posee una capacidad reducida de producción de ácido láctico de cómo mínimo 20 veces con respecto a la cepa silvestre.

Otro aspecto de la invención es un método de producción de 2,3-butanodiol que comprende la fermentación aeróbica de un medio rico en carbohidratos por la cepa bacteriana *L. lactis* 43103 descrita arriba.

En una realización particular, el método de producción de 2,3-butanodiol comprende los siguientes pasos:

- (a) Pre-cultivo de la cepa de la invención;
- (b) Inoculación de un medio rico en carbohidratos con el pre-cultivo obtenido en la etapa (a);
- (c) Fermentación de los carbohidratos del medio inoculado en la etapa (b) a 25-35 °C; pH 5,5-7,0 y concentración de oxígeno disuelto de 5-100%; y
- (d) Separación de las células del medio fermentado resultante de la etapa (c).

A destacar, la concentración de oxígeno se expresa como un % con respecto a la concentración de saturación del medio.

En una realización particular, el método de producción de 2,3-butanodiol comprende los siguientes pasos:

- (a) Pre-cultivo de la cepa de la invención;
- (b) Inoculación de un medio rico en carbohidratos con el pre-cultivo obtenido en la etapa (a);
- (c) Fermentación de los carbohidratos del medio inoculado en la etapa (b) a 25-35 °C; pH 5,5-7,0 y concentración de oxígeno disuelto de 10-90%; y
- (d) Separación de las células del medio fermentado resultante de la etapa (c).

En una realización particular, el método de producción de 2,3-butanodiol comprende los siguientes pasos:

- (a) Pre-cultivo de la cepa de la invención;
- (b) Inoculación de un medio rico en carbohidratos con el pre-cultivo obtenido en la etapa (a);
- (c) Fermentación de los carbohidratos del medio inoculado en la etapa (b) a 25-35 °C; pH 5,5-6,0 y concentración de oxígeno disuelto de 5-100%; y
- (d) Separación de las células del medio fermentado resultante de la etapa (c).

En una realización particular, el método de producción de 2,3-butanodiol comprende los siguientes pasos:

- (a) Pre-cultivo de la cepa de la invención;
- (b) Inoculación de un medio rico en carbohidratos con el pre-cultivo obtenido en la etapa (a);
- (c) Fermentación de los carbohidratos del medio inoculado en la etapa (b) a 25-35 °C; pH 5,5-6,0 y concentración de oxígeno disuelto de 10-90%; y
- (d) Separación de las células del medio fermentado resultante de la etapa (c).

En una realización particular, el método de producción de 2,3-butanodiol comprende, adicionalmente, una etapa de purificación del 2,3-butanodiol presente en el medio libre de células resultante de la etapa d).

En una realización particular, la fermentación de la etapa c) es continua.

En una realización particular, la fermentación de la etapa c) es semi-continua.

En una realización particular, la fermentación de la etapa c) es discontinua.

El 2,3-BDO se acumula en el medio de cultivo durante un periodo de 15-48 horas, preferiblemente entre las 20 y 40 horas, desde el inicio del cultivo, que coincide con el momento de la inoculación. Cuando se alcanza la máxima producción de 2,3-BDO, que ocurre cuando el microorganismo ha consumido la totalidad del carbohidrato disponible como fuente de carbono, la fermentación se puede considerar concluida. Una vez concluida la fermentación, las células de la cepa de la invención deben ser en primer lugar separadas del medio de cultivo líquido. Tal separación se puede realizar preferentemente mediante procedimientos físicos, tales como sedimentación por centrifugación, filtración o cualquier otro de los disponibles en el estado de la técnica.

El 2,3-BDO producido, que se encuentra disuelto en el medio de fermentación, puede ser a continuación purificado o utilizado directamente tal como se presenta en disolución acuosa, en este último caso bien sin posterior modificación o bien tras realizar un proceso de concentración. La purificación, en caso de realizarse, puede llevarse a cabo empleando alguna de las técnicas que el estado de la técnica ofrece, bien en solitario bien combinando varias de ellas, entre las que se encuentran, entre otras: destilación, evaporación, ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis directa, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, extracción con fluidos supercríticos, métodos cromatográficos y otros.

Otro aspecto de la invención, es un método de producción de acetoina que comprende la fermentación aeróbica de un medio rico en carbohidratos por la cepa bacteriana *L. lactis* 43103 de la invención.

Sorprendentemente se ha encontrado que el perfil de producción de metabolitos de la cepa de la invención depende mucho de las condiciones de cultivo. Ésta produce mayoritariamente 2,3-BDO cuando su cultivo se realiza en condiciones de aerobiosis a un valor de pH ligeramente ácido, comprendido entre 5,5 y 6,0. Sin embargo, cuando la fermentación se realiza en condiciones también aeróbicas, pero a un valor de pH superior, cercano a la neutralidad, el producto mayoritario de la fermentación es la acetoina. Por "principalmente" se entiende que el referido metabolito representa el 45-95%, preferentemente el 65-95%, de la totalidad de los productos de fermentación. En particular, el 70-95%, preferiblemente el 80-95%, de los productos de fermentación corresponden al 2,3-BDO cuando la fermentación se realiza a un pH de 5,5-6,0. Cuando la fermentación se lleva a cabo a pH 6,5-7,0, la cepa produce acetoina en una cantidad correspondiente del 45 al 95%, preferentemente, del 65 al 80%, de los productos de fermentación.

En una realización particular, el método de producción de acetoina comprende los siguientes pasos:

- (a) Pre-cultivo de la cepa de la invención;
- (b) Inoculación de un medio rico en carbohidratos con el pre-cultivo obtenido en la etapa (a);
- (c) Fermentación de los carbohidratos del medio inoculado en la etapa (b) a 25-35 °C; pH 6,5-7,5 y concentración de oxígeno disuelto de 30-100%; y
- (d) Separación de las células del medio fermentado resultante de la etapa (c).

En una realización particular, el método de producción de acetoina comprende, adicionalmente, una etapa de purificación de la acetoina presente en el medio libre de células resultante de la etapa d).

En una realización particular, la fermentación de la etapa c) es continua.

En una realización particular, la fermentación de la etapa c) es semi-continua.

En una realización particular, la fermentación de la etapa c) es discontinua.

La acetoina se acumula en el medio de cultivo durante un periodo de 15-40 horas, preferiblemente entre las 18 y 24 horas, desde el inicio del cultivo, que coincide con el momento de la inoculación. Cuando se alcanza la máxima producción de acetoina, que ocurre cuando el microorganismo ha consumido la totalidad del carbohidrato disponible como fuente de carbono, la fermentación se puede considerar concluida.

5

Otro aspecto de la invención es un método de producción de ácido láctico que comprende la fermentación anaeróbica de un medio rico en carbohidratos por la cepa *L. lactis* 43103 de la invención.

En una realización particular, el método de producción de ácido láctico comprende los siguientes pasos:

10

- (a) Pre-cultivo de la cepa según de la invención;
- (b) Inoculación de un medio rico en carbohidratos con el pre-cultivo obtenido en la etapa (a);
- (c) Fermentación de los carbohidratos del medio inoculado en la etapa (b) a 25-35 °C; pH 6,0-7,5 y en condiciones de anaerobiosis; y
- (d) Separación del medio fermentado en la etapa (c) de las células.

15

En una realización particular, el método de producción de ácido láctico comprende, adicionalmente, una etapa de purificación del ácido láctico presente en el medio libre de células resultante de la etapa d).

En una realización particular, la fermentación de la etapa c) es continua.

20

En una realización particular, la fermentación de la etapa c) es semi-continua.

En una realización particular, la fermentación de la etapa c) es discontinua.

25

A destacar, en estas realizaciones el ácido láctico se acumula en el medio de cultivo durante un periodo de 15-40 horas, preferiblemente entre las 20 y 30 horas, desde el inicio del cultivo, que coincide con el momento de la inoculación. Cuando se alcanza la máxima producción de ácido láctico, que ocurre cuando el microorganismo ha consumido la totalidad del carbohidrato disponible como fuente de carbono, la fermentación se puede considerar concluida.

30

En una realización particular, el carbohidrato fermentable es seleccionado del grupo formado por glucosa, xilosa, fructosa, manosa, galactosa, sacarosa, lactosa y melazas, y combinaciones de las mismas.

En otra realización particular, el medio de fermentación contiene una fuente de nitrógeno seleccionada del grupo formado por el extracto de carne, el extracto de levadura, el líquido de maceración del maíz (*corn steep liquor* - CSL), los hidrolizados de proteínas o peptonas de carne, de soja y de caseína, y, en general, los hidrolizados de subproductos agroalimentarios ricos en proteína, tales como la pasta o harina de soja, el lactosuero y los granos secos de destilería con solubles (*dry distillers grains with solubles* - DDGS), y combinaciones de las mismas.

35

En otra realización particular, el medio puede suplementarse con otros nutrientes y factores de crecimiento, tales como vitaminas y sales minerales, para asistir en el crecimiento del microorganismo y promover la producción de 2,3-BDO. Las vitaminas que pueden emplearse incluyen entre otras la piridoxamina, la biotina, el ácido nicotínico, el pantotenato cálcico, la riboflavina y el ácido lipoico, que pueden añadirse bien mediante mezclas artificiales de composición conocida o bien a través del empleo de preparaciones y extractos nutritivos complejos de origen natural conteniendo tales vitaminas, como por ejemplo el extracto de levadura, el CSL u otros. Las sales minerales pueden seleccionarse preferentemente del grupo formado por el fosfato y las sales de potasio y magnesio.

45

En otra realización particular, el medio rico en carbohidratos puede también suplementarse adicionalmente, si fuera necesario por la excesiva formación de espumas durante el cultivo, con un agente antiespumante, como por ejemplo los basados en silicona, aceites vegetales, polietilenglicol y otros, de acuerdo a los métodos conocidos.

50

En otra realización particular, el cultivo de la cepa de la invención en el medio rico en carbohidratos se puede llevar a cabo por medio de cualquier tecnología estándar de cultivo aeróbico. Los métodos de cultivo en medios nutritivos líquidos son los preferidos, particularmente los cultivos en frascos agitados o en reactores del tipo de fermentadores o quimiostatos.

55

En otra realización particular, las características aerobias del cultivo se pueden garantizar mediante el aporte al medio de cultivo de oxígeno, bien en forma de aire, oxígeno puro o mezclas de diferente composición de ambos. En el caso de cultivos en frascos agitados, el suministro de oxígeno se realiza mediante la agitación de los recipientes de cultivo a una frecuencia comprendida entre 100 y 500 rpm, preferiblemente en el intervalo 200-300 rpm. En el caso de la utilización de reactores de cultivo, el suministro de oxígeno se puede realizar mediante el flujo a través del medio de cultivo de una corriente de aire, oxígeno puro o mezclas de diferente composición de ambos, tal que la concentración de oxígeno disuelto esté comprendida en el intervalo 5-100%, preferiblemente entre el 10 y el 90%, de la concentración

60



de saturación. La agitación del medio de cultivo en el reactor se puede realizar con ayuda de un agitador de palas, operando a una velocidad de giro entre 250 y 1000 rpm, preferiblemente en el intervalo 500-750 rpm.

En una realización particular, el cultivo de la cepa de la invención en el medio rico en carbohidratos se puede llevar a cabo por medio de cualquier tecnología estándar de cultivo anaeróbico. Los métodos de cultivo en medios nutritivos líquidos son los preferidos, particularmente los cultivos en frascos o en reactores del tipo de fermentadores o quimiostatos.

En una realización particular, las características anaerobias del cultivo se pueden garantizar mediante el aislamiento del medio de cultivo del oxígeno ambiental. En el caso de cultivos en frascos, el aislamiento se realiza mediante la ausencia de agitación de los recipientes de cultivo o del cierre hermético de los mismos. En el caso de la utilización de reactores de cultivo, el aislamiento se puede realizar mediante el cierre hermético de los mismos y/o mediante el flujo a través del medio de cultivo de una corriente de gas libre de oxígeno. La agitación del medio de cultivo en el reactor se puede realizar con ayuda de un agitador de palas, operando a una velocidad de giro entre 250 y 1000 rpm, preferiblemente en el intervalo 400-600 rpm.

En una realización particular, el control del pH del medio, cuando sea necesario su mantenimiento a un valor fijo, se puede realizar mediante la adición, al medio, de un agente tamponante elegido entre cualquiera de los habitualmente utilizados para tal fin, o mediante la adición de una base o un ácido, según sea requerido uno u otro, para contrarrestar las acidificaciones o alcalinizaciones, respectivamente, que el cultivo microbiano pudiera ocasionar.

La invención también proporciona una cepa de *Lactococcus lactis* 43103 que tiene una capacidad aumentada de producir 2,3-BDO de al menos 10 veces, preferiblemente, 20 veces la cantidad producida por la cepa de tipo salvaje de la que deriva, una capacidad aumentada de producir acetoina de al menos 10 veces, preferiblemente, 20 veces la cantidad producida por la cepa de tipo salvaje de la que deriva y una capacidad disminuida de producir ácido láctico de al menos 10 veces la cantidad producida por la cepa de tipo salvaje de la que deriva, cuando se cultiva en condiciones aeróbicas. Alternativa o adicionalmente, la cepa de la invención produce principalmente 2,3-BDO o acetoina dependiendo del pH del cultivo. Por ejemplo, la cepa de la invención produce 2,3-BDO en una cantidad que corresponde del 70 al 95% de los productos totales de fermentación cuando se cultiva en un medio rico en carbohidratos a 20-40 °C, pH 5,5-6,0 y concentración de oxígeno disuelto del 5-100% y produce acetoina en una cantidad que corresponde del 45 al 80% de los productos de fermentación cuando se cultiva en un medio rico en carbohidratos a 20-40 °C, pH 6,5-7,5 y concentración de oxígeno disuelto del 30-100%. Preferentemente, la cepa de la invención produce 2,3-BDO en una cantidad que corresponde del 80 al 95% del total de los productos de fermentación cuando se cultiva en un medio rico en carbohidratos a 20-40 °C, pH 5,5-6,0 y 10-90% de concentración de oxígeno disuelto y produce acetoina en una cantidad que corresponde del 65 al 80% de los productos de fermentación cuando se cultiva en un medio rico en carbohidratos a 20-40 °C, pH 6,8-7,2 (por ejemplo pH 7) y 30-100% de concentración de oxígeno disuelto. La cepa de tipo salvaje de *Lactococcus lactis* puede ser *Lactococcus lactis* NCIMB 702118. Además, la cepa de la invención puede obtenerse mediante la fusión de protoplastos de dos cepas parentales de *L. lactis* productoras de 2,3-BDO y/o acetoina que se derivan de una cepa de tipo salvaje como se ha descrito anteriormente. La cepa de tipo salvaje puede ser *Lactococcus lactis* NCIMB 702118.

Con el objetivo de mejorar la claridad de la materia descrita en la presente, se proporcionan las siguientes definiciones que deben ser aplicadas en toda la memoria y en especial a las reivindicaciones.

Por el término “*Genome shuffling*” (“mezclado de genomas”) se entiende en esta memoria un método basado en la mezcla de los genomas de 2 o más cepas o microorganismos en uno sólo, tras un proceso de fusión de los protoplastos y recombinación. La recombinación se da básicamente de manera aleatoria. Esto posibilita la generación de una gran librería de derivados recombinantes con gran variedad de genomas y fenotipos diversos. Estos últimos pueden ser más tarde sujetos a selección y/o cribado para aislar sólo aquellos recombinantes dotados de características fenotípicas y propiedades deseadas. Típicamente el “*Genome shuffling*” se realiza con dos o más cepas mutantes que tengan cierta diversidad genética para poder buscar combinaciones ventajosas de esas diversidades.

Por el término “cepa silvestre” (*wild type* en inglés) se entiende en esta memoria la cepa de la bacteria que ocurre en la naturaleza, es decir, aquella que no ha sido manipulada por el hombre mediante ninguna técnica con el fin de alterar sus características genéticas o fenotípicas.

El término “pre-cultivo”, tal como se utiliza aquí, hace referencia a un cultivo preliminar a pequeña escala en frascos agitados de la cepa correspondiente, que será utilizado para inocular el caldo de cultivo en el que se realizará la fermentación. El pre-cultivo de la cepa de la invención se puede realizar durante 24 horas en medio YEC, bajo las condiciones descritas en la sección de Procedimientos Generales.

El término “medio rico en carbohidratos”, tal como se utiliza aquí, hace referencia a cualquier medio de cultivo que contenga unas fuentes de energía, carbono y nitrógeno asimilables por la cepa de la invención y que permita su

crecimiento y una elevada producción de 2,3-BDO, acetoína o ácido láctico, según las condiciones de cultivo, por parte de ella. Entre las fuentes de carbono asimilables se pueden utilizar, por ejemplo, sin que sea limitante, glucosa, xilosa, fructosa, manosa, galactosa, sacarosa, lactosa y melazas, y mezclas de las mismas. Entre las fuentes de nitrógeno asimilables se incluyen por ejemplo, pero sin estar restringidas a ellas, el extracto de carne, el extracto de levadura, el líquido de maceración del maíz (*corn steep liquor* - CSL), los hidrolizados de proteínas o peptonas de carne, de soja y de caseína, y, en general, los hidrolizados de subproductos agroalimentarios ricos en proteína, tales como la pasta o harina de soja, el lactosuero y los granos secos de destilería con solubles (*dry distillers grains with solubles* - DDGS), y combinaciones de las mismas.

- 10 El término "protoplasto", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una célula bacteriana a la que se le ha desprovisto de la pared celular mediante tratamiento enzimático en un medio estabilizado osmóticamente.

El término "fermentación aeróbica", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una fermentación en un ambiente aeróbico, es decir, un ambiente con oxígeno. El término "fermentación anaeróbica", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una fermentación en un ambiente anaeróbico, es decir, falta de oxígeno. La fermentación, en un sentido amplio, es un proceso metabólico que convierte carbohidratos en diversos bioproductos.

- 15 El término "capacidad incrementada de producción de acetoína y/o 2,3-butanodiol comparada con una cepa de *L. lactis* silvestre", tal y como se utiliza aquí sobre una cepa modificada, hace referencia a que dicha cepa produce una mayor cantidad de los metabolitos (acetoína y/o 2,3 butanodiol) que la cepa silvestre tal y como se detecta en los ejemplos mediante el uso, de las técnicas descritas en la sección de Procedimientos generales.

- 20 El término "capacidad reducida de producción de ácido láctico comparada con una cepa de *L. lactis* silvestre", tal y como se utiliza aquí sobre una cepa modificada, hace referencia a que dicha cepa produce una menor cantidad de ácido láctico que la cepa silvestre tal y como se detecta en los ejemplos mediante el uso de las técnicas descritas en la sección de Procedimientos generales.

### Ejemplos

- La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

#### Procedimientos generales

- Microorganismos: Los microorganismos que se utilizaron en esta invención fueron bacterias ácido lácticas de las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* CML B4 (patente española ES2352633B1), *L. lactis* subsp. *lactis* CML B3 y *L. lactis* subsp. *lactis* 43103. Todas estas cepas derivan de la cepa de tipo silvestre *L. lactis* subsp. *lactis* NCIMB 702118.

Medios de cultivo: Los cultivos en frascos agitados se realizaron en medio YEC, cuya composición es la siguiente: glucosa 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, y tampón citrato sódico (pH 7.0) 20 mM.

- Los cultivos en fermentador se realizaron en un medio rico en carbohidratos. El término "medio rico en carbohidratos", tal como se utiliza aquí, hace referencia a cualquier medio de cultivo de los conocidos en el estado de la técnica, que contenga unas fuentes de energía, carbono y nitrógeno asimilables por la cepa 43103, y que permita su crecimiento y una elevada producción de 2,3-BDO, o acetoína o ácido láctico por parte de ella. En concreto, el medio rico en carbohidratos utilizado en los ejemplos descritos en esta patente contiene una concentración inicial de carbohidratos de 100 g/L, en la forma de glucosa o sacarosa.

Métodos de cultivo: A lo largo de esta invención se utilizaron los siguientes métodos de cultivo:

- A. Cultivos en frascos agitados: Los cultivos en frascos agitados se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 20 mL de medio YEC, a temperatura ambiente y con una agitación de 250 rpm. Los cultivos se iniciaron con la inoculación del medio con un inóculo del 1% (v/v) procedente de un pre-cultivo realizado en medio YEC y crecido durante 24 horas, tras ser inoculado con una colonia crecida durante tres días en una placa conteniendo el mismo medio y solidificado con agar al 1,5% (p/v).

- B. Cultivos en fermentador (*batch*): Los cultivos en fermentador se realizaron en modo discontinuo por lotes (*batch*) en un fermentador de laboratorio equipado con un reactor de 1 L conteniendo 750 mL de un medio rico en carbohidratos. Las fermentaciones se realizaron a 30 °C y una velocidad de agitación de 500 o 750 rpm. En los cultivos aerobios, la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo fija en un valor de entre el 10 y el 30% con respecto a la concentración de saturación del medio, mediante el suministro de un caudal de aire de 1 L/L/min, en solitario o enriquecido con oxígeno puro. En los cultivos anaerobios, la velocidad de agitación se fijó en 500 rpm y se eliminó el suministro de aire. El pH del medio durante la fermentación se fijó en diferentes valores de experimento en experimento, y se mantuvo constante mediante la adición automática de NaOH 5 M. Las fermentaciones se iniciaron con la inoculación del medio con 100 mL de un cultivo en medio YEC crecido en frasco agitado de 500 mL durante 24 h, inoculado a su vez con un vial de la propia bacteria en glicerol al 10% conservado a -80 °C.

C. Cultivos en fermentador (*fed-batch*): Los cultivos en fermentadores alimentados por lotes se llevaron a cabo como en el método B, pero incluyendo una alimentación adicional de 100 g/L de glucosa cuando la fuente de carbono se acercaba al agotamiento.

5

**Medida de la concentración de metabolitos:** Las concentraciones de 2,3-BDO, acetoína, lactato, acetato, etanol y glucosa o sacarosa en muestras del medio de cultivo se determinaron mediante HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H 300 x 7,8mm (Bio Rad) y una precolumna Microguard Cation H Refill Cartridge, con las siguientes condiciones: fase móvil, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N; flujo, 0,7 mL/min; temperatura de la columna, 55 °C; temperatura del detector, 35 °C. La cuantificación de los picos se realizó por medio de un detector de índice de refracción.

10

**Medida del crecimiento bacteriano:** El crecimiento bacteriano en medio YEC se estimó mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) de suspensiones celulares convenientemente diluidas. En el caso de cultivos en un medio rico en carbohidratos, el crecimiento bacteriano no se pudo determinar a causa de la presencia de partículas insolubles en el medio de cultivo, que interferían en las medidas.

15

### **Ejemplo 1**

#### **Obtención de la cepa mutante *L. lactis* B3**

Una colonia de la cepa de tipo silvestre *L. lactis* NCIMB 702118 se cultivó a 30 °C (250 rpm) en un frasco conteniendo 10 mL de medio M17 (Terzaghi, B.E. y Sandine, W.E. (1975) Appl. Microbiol. 29; 807-813; composición en g/L: triptona, 2,5; peptona de carne, 2,5; peptona de soja, 5,0; extracto de carne, 5,0; extracto de levadura, 2,5; glicerofosfato sódico, 19,0; sulfato de magnesio, 0,25; y ácido ascórbico, 0,50) suplementado con glucosa al 1% durante 24 horas. Las células se lavaron a continuación en tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7,5) dos veces y se resuspendieron en 1 mL del mismo tampón. A esta suspensión celular se añadieron 120 µL del mutágeno químico metanosulfonato de etilo y se incubó a 25 °C con suave agitación durante 15 min. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con 10 mL del mismo tampón fosfato dos veces, se resuspendieron en 10 mL de medio M17 con glucosa al 1% y la suspensión se incubó a 30 °C con agitación durante 1 hora.

25

Finalmente, cantidades apropiadas de esta suspensión o de diluciones suyas, tales que dieran lugar a 400-500 colonias por placa, se extendieron sobre placas del medio de selección. El medio de selección empleado fue un medio derivado del medio M17 con una menor capacidad tamponante, ya que contenía tan sólo un 5% (0,95 g/L) del glicerofosfato sódico de éste, y que además estaba suplementado con 100 mg/L de 2,3,5-trifenil tetrazolio. En este medio las cepas de tipo silvestre forman colonias de color ligeramente rosado, mientras que las cepas con una menor capacidad de formación de ácido dan lugar a colonias de color rojo/pardo.

30

Se analizaron alrededor de 26.000 colonias. Del análisis se obtuvieron únicamente cuatro colonias de color rojo/pardo en el medio de selección, que se aislaron y analizaron para determinar su capacidad de producción de metabolitos. Entre estas cuatro colonias se seleccionó finalmente la cepa *L. lactis* B3 puesto que era la que mostraba los mayores niveles de producción de 2,3-BDO y los menores de ácido láctico. En la tabla 1 se muestran los resultados de crecimiento y producción de metabolitos.

35

### **Ejemplo 2**

#### **Obtención de la cepa *L. lactis* 43103**

La cepa *L. lactis* 43103 se obtuvo utilizando la técnica de *genome shuffling*, mediante la fusión de protoplastos de las cepas mutantes B4 y B3.

De sendos cultivos de las cepas B4 y B3, crecidos durante 20 h en frascos agitados, se tomó 1 mL y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. Las células se lavaron tres veces en medio PM (*Protoplasting Medium*: Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), CaCl<sub>2</sub> 20 mM y sacarosa 0,5 M) y se resuspendieron finalmente en 650 µL de medio PM suplementado con lisozima 5 mg/mL y mutanolisina 100 U/mL. Las suspensiones bacterianas se incubaron a 37 °C durante 2 h, con ligera agitación, para obtener los protoplastos correspondientes. Los protoplastos obtenidos de cada cepa se lavaron un par de veces en medio PM y se resuspendieron finalmente en 0,5 mL de este mismo medio.

45

Una alícuota de 100 µL de la suspensión de protoplastos de la cepa B4 se sometió a un tratamiento térmico en un baño a 60 °C durante 30 min para inactivar los protoplastos.

50

En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se mezclaron 50 µL de las suspensiones de protoplastos de las cepas B4 (inactivados térmicamente) y B3 (no inactivados), se les añadió a continuación 900 µL de medio PM suplementado con PEG 6000 50%, mezclando suavemente, y se incubó a 37 °C durante 10 min para inducir la fusión de los protoplastos. Trascurrido este periodo, la suspensión se lavó un par de veces en medio PM para finalizar el proceso de fusión de protoplastos. Se utilizó la totalidad de la suspensión resultante para inocular un matraz erlenmeyer de 100 mL conteniendo 5 mL de medio RM (*Regeneration Medium*: glucosa 1%, extracto de levadura 5 g/L, ácido cítrico 20 mM (pH 7,0), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 25 mM, gelatina 2,5%, sacarosa 0,5 M) y se dejó crecer con agitación de 125 rpm a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

55

60

Diluciones apropiadas del cultivo del cruce de los protoplastos de las cepas B4 y B3 se sembraron sobre placas de agar de medio YEC sin tamponar (carente de citrato) suplementadas con 2,3,5-trifenil tetrazolio 100 mg/L y se dejaron crecer durante 48 h, hasta la aparición de colonias. Se aislaron en una nueva placa de agar del mismo medio un total

de 18 colonias que presentaban un aspecto distintivo y se procedió al análisis del crecimiento y producción de metabolitos (por el método A) de todas las colonias aisladas, y se comparó con los de las cepas parentales B4 y B3 y la de tipo silvestre. Entre todas las cepas aisladas, una de ellas, denominada 43103, mostró los mejores resultados en lo que al balance de la producción de acetoína/2,3-BDO/ácido láctico se refiere. Los resultados se muestran en la 5 tabla 1.

**Tabla 1.** Crecimiento y producción de metabolitos (método A) por cultivos de 24 horas de la cepa de tipo silvestre de *L. lactis*, y de las cepas mutantes B4, B3 y 43103 en medio YEC.

Cepa	OD <sub>600</sub>	Acetoína	2,3-BDO	Lactato
Tipo silvestre*	2,3	<1,0	<0,5	40,5
B4	4,5	52,8	2,9	8,5
B3	4,0	27,4	14,2	34,4
43103	4,3	44,5	11,9	6,8

10 Todas las concentraciones de metabolitos se encuentran expresadas en mM.

\*Más de la mitad de la glucosa permanece sin consumir por el reducido tamponamiento del medio y la elevada producción de ácido láctico.

15

### **Ejemplos 3-6**

#### **Fermentaciones aeróbicas de un medio de melaza de remolacha por la cepa *L. lactis* 43103 a diferentes valores de pH**

Se utilizó la cepa *L. lactis* 43103 para llevar a cabo una serie de fermentaciones aeróbicas de un medio rico en 20 carbohidratos, que contenía melaza de remolacha como fuente de carbono, a diferentes valores de pH entre 7,0 y 5,5, según el método B descrito en la sección de métodos generales. La concentración de oxígeno disuelto se fijó en un 30% y la velocidad de agitación en 750 rpm. Los resultados de la producción de metabolitos se muestran en la tabla 2.

25 **Tabla 2.** Producción de metabolitos (método B) en fermentaciones aeróbicas de la cepa *L. lactis* 43103 a varios valores de pH.

pH	Acetoína	2,3-BDO	Lactato
7,0	376	99	90
6,5	365	216	214
6,0	183	378	205
5,5	57	371	75

Todas las concentraciones se encuentran expresadas en mM.

### **Ejemplos 7-11**

#### **30 Fermentación aeróbica de un medio de melaza de remolacha por la cepa *L. lactis* 43103 a pH 5,5 y diferentes valores de la concentración de oxígeno disuelto y de la velocidad de agitación del medio**

La cepa *L. lactis* 43103 se utilizó para llevar a cabo una serie de fermentaciones aeróbicas de un medio rico en 35 carbohidratos, que contenía melaza de remolacha como fuente de carbono, a un pH de 5,5 y diferentes valores de concentración de oxígeno disuelto, entre el 10 y el 30%, y de velocidad de agitación, entre 500 y 750 rpm, según el método B descrito en la sección Métodos generales. Los resultados de la producción de metabolitos se muestran en la tabla 3, donde se incluyen como referencia los valores obtenidos previamente al 30% de oxígeno disuelto y 750 rpm.

40 **Tabla 3.** Producción de metabolitos en fermentaciones aeróbicas (método B) de la cepa *L. lactis* 43103 a pH 5,5, y a diferentes valores de la concentración de oxígeno disuelto y de la velocidad de agitación del medio.

DO <sup>1</sup>	V. agit. <sup>2</sup>	Acetoína	2,3-BDO	Lactato
-----------------	-----------------------	----------	---------	---------

30%	750	57	371	75
20%	750	43	479	77
10%	750	35	589	132
30%	500	53	436	95
20%	500	57	556	121
10%	500	42	515	113

Todas las concentraciones se encuentran expresadas en mM.

<sup>1</sup>DO, concentración de oxígeno disuelto, expresada en porcentaje con respecto a la concentración de saturación.

<sup>2</sup>V. agit., velocidad de agitación del medio, expresada en rpm.

5

#### Ejemplos 12-14

#### Fermentaciones aeróbicas de un medio que contiene diferentes fuentes de carbono por la cepa *L. lactis* 43103 a pH 5,5

La cepa *L. lactis* 43103 se utilizó para llevar a cabo una serie de fermentaciones aeróbicas de un medio rico en carbohidratos, que contenía glucosa pura, jarabe de glucosa o sacarosa pura como fuentes de carbono, a pH 5,5, concentración de oxígeno disuelto del 10% y velocidad de agitación de 750 rpm, según el método B descrito en la sección de métodos generales. Los resultados de la producción de metabolitos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Producción de metabolitos en fermentaciones aeróbicas de un medio de glucosa, jarabe de glucosa o sacarosa (método B) por la cepa *L. lactis* 43103 a pH 5,5.

Fuente de Carbono	Acetoina	2,3-BDO	Lactato
Glucosa	65	491	33
Jarabe de glucosa	14	556	90
Sacarosa	35	578	71

Todas las concentraciones se encuentran expresadas en mM.

#### Ejemplo 15

#### Fermentación aeróbica por lotes alimentados de un medio que contiene glucosa por la cepa *L. lactis* 43103 a pH 6,0

La cepa *L. lactis* 43103 se utilizó para llevar a cabo una fermentación aeróbica bajo el modo de alimentación por lotes de un medio rico en carbohidratos, que contenía glucosa como fuente de carbono, a pH 6,0, una concentración de oxígeno disuelto del 10% y una velocidad de agitación de 750 rpm, según el método C descrito en la sección Métodos generales. Los resultados de la producción de metabolitos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Producción de metabolitos en una fermentación aeróbica por lotes alimentados de un medio con glucosa (método C) por la cepa *L. lactis* 43103 a pH 6,0.

Fuente de Carbono	Acetoina	2,3-BDO	Lactato
Glucosa	40	851	47

Todas las concentraciones se encuentran expresadas en mM.

#### Ejemplo 16

#### Fermentación anaeróbica de un medio de melaza de remolacha por la cepa *L. lactis* 43103

La cepa *L. lactis* 43103 se utilizó para llevar a cabo una fermentación anaeróbica de un medio rico en carbohidratos, que contenía melaza de remolacha como fuente de carbono, según el método B descrito en la sección de Métodos generales. Los resultados de la producción de metabolitos se muestran en la tabla 5.

Tabla 6. Producción de metabolitos en una fermentación anaeróbica de un medio de melaza de remolacha (método B) por la cepa *L. lactis* 43103.

Oxígeno	Acetoina	2,3-BDO	Lactato
---------	----------	---------	---------

Anaerobiosis	7	79	975
--------------	---	----	-----

Las concentraciones de metabolitos se expresan en mM.

#### REFERENCES CITED IN THE APPLICATION

- 5 Hassler, T., et al. "Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365" *Bioresource technology* 2012 vol.124, pp. 237-244
- Ge, Y., et al. "Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis*". *Green Chemistry*, 2016
- Nielsen, D.R., et al. "Metabolic Engineering of Acetoin and meso-2,3-Butanediol Biosynthesis in *E. coli*.", *Biotechnol. J.* 2010, vol. 5, pp. 274-284
- 10 Lian, J., et al. "Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R,3R)-butanediol" *Metabolic engineering* 2014, vol. 23, pp. 92-99
- Platteuw C, et al. "Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*-influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate-dehydrogenase as a function of culture conditions", *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, vol. 61, pp. 3967-71
- 15 Gaspar P, et al. "High yields of 2,3-butanediol and mannitol in *Lactococcus lactis* through engineering of NAD(+) cofactor recycling", *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, vol. 77, pp. 6826-35
- Liu J, et al. "Combining metabolic engineering and biocompatible chemistry for high-yield production of homo-diacetyl and homo-(S,S)-2,3-butanediol", *Metabolic engineering* 2016, vol. 36, pp. 57-67
- 20 PCT/US2009/058834
- Zhang YX, et al. "Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria", *Nature* 2002, vol. 415, pp. 644-646
- FR2777905
- ES2352633B1
- 25 Terzaghi BE, Sandine WE, "Improved medium for Lactic Streptococci and their bacteriophages", *Appl. Microbiol.*, 1975, vol. 29, pp. 807-813

# REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Lactococcus lactis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 9139.
- 5 2. Un método de producción de 2,3-butanediol que comprende la fermentación aeróbica de un medio de cultivo rico en carbohidratos por una cepa bacteriana como se define en la reivindicación 1.
3. El método de producción de 2,3-butanediol según la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas:  
10 (a) Pre-cultivo de una cepa como se define en la reivindicación 1;  
(b) Inoculación de un medio de cultivo rico en carbohidratos con el pre-cultivo obtenido en el paso (a);  
(c) Fermentación de los carbohidratos presentes en el medio de cultivo inoculado en la etapa (b) a 20-40 °C; pH 5,5-6,0 y concentración de oxígeno disuelto del 5-100%; y  
15 d) Separación de las células del caldo fermentado resultante de la etapa c).
4. El método de producción de 2,3-butanediol según la reivindicación 3, que comprende adicionalmente una etapa de purificación del 2,3-butanediol presente en el caldo de fermentación libre de células resultante de la etapa d).
5. Un método de producción de acetoína, que comprende la fermentación aeróbica de un medio de cultivo rico en  
20 carbohidratos por una cepa bacteriana como se define en la reivindicación 1.
6. El método de producción de acetoína según la reivindicación 5, que comprende las siguientes etapas:  
(a) Pre-cultivo de una cepa como se define en la reivindicación 1;  
(b) Inoculación de un medio de cultivo rico en carbohidratos con el pre-cultivo obtenido en la etapa (a);  
25 (c) Fermentación de los carbohidratos presentes en el medio de cultivo inoculado en la etapa (b) a 20-40 °C; pH 6,5-7,5 y 30-100% de concentración de oxígeno disuelto; y  
d) Separación de las células del caldo fermentado resultante de la etapa c).
7. El método de producción de acetoína según la reivindicación 6, que comprende adicionalmente una etapa de  
30 purificación de la acetoína presente en el caldo de fermentación libre de células resultante de la etapa (d).
8. Un método de producción de ácido láctico que comprende la fermentación anaeróbica de un medio de cultivo rico en carbohidratos por una cepa bacteriana como se define en la reivindicación 1.

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patentes citados en la descripción

- EP16382347 [0001]
- US2009058834W [0015] [0121]
- FR2777905 [0030] [0121]
- ES2352633B1 [0030] [0098]

## Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **HASSLER, T. et al.** Enhanced fed-batch fermentation of 2, 3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 *Bioresource technology*, 2012, vol. 124, 237-244 [0011]
- **GE, Y. et al.** Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis* *Green Chemistry*, 2016 [0011] [0121]
- **NIELSEN, D. R. et al.** Metabolic Engineering of Acetoin and meso-2,3-Butanediol Biosynthesis in *E. coli* *Biotechnol. J.*, 2010, vol. 5, 274-284 [0012] [0121]
- **LIAN, J. et al.** Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R, 3R)-butanediol *Metabolic engineering*, 2014, vol. 23, 92-99 [0012]
- **PLATTEEUW C et al.** Metabolic engineering of *Lactococcus lactis* - influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate-dehydrogenase as a function of culture conditions *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, 3967-71 [0015]
- **GASPAR P et al.** High yields of 2,3-butanediol and mannitol in *Lactococcus lactis* through engineering of NAD(+) cofactor recycling *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, vol. 77, 6826-35 [0015] [0121]
- **LIU J et al.** Combining metabolic engineering and biocompatible chemistry for high-yield production of homo-diacetyl and homo-(S,S)-2,3-butanediol *Metabolic engineering*, 2016, vol. 36, 57-67 [0015] [0121]
- **ZHANG YX et al.** Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria *Nature*, 2002, vol. 415, 644-646 [0021] [0121]
- **TERZAGHI BESANDINE WE** Improved medium for Lactic Streptococci and their bacteriophages *Appl. Microbiol.*, 1975, vol. 29, 807-813 [0103] [0121]
- **HASSLER, T. et al.** Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 *Bioresource technology*, 2012, vol. 124, 237-244 [0121]
- **LIAN, J. et al.** Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R,3R)-butanediol *Metabolic engineering*, 2014, vol. 23, 92-99 [0121]
- **PLATTEEUW C et al.** Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*-influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate-dehydrogenase as a function of culture conditions *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, 3967-71 [0121]