

(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 Sebastián, Guipúzcoa, ES

(72) Inventor/es:

RONCAL MARTÍNEZ, TOMÁS;
CABALLERO ROMÁN, SUSANA;
DÍAZ DE GUERÉÑU 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

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 acetona, 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 J g⁻¹, similar a los del etanol (29.100 J g⁻¹) y metanol (22.100 J g⁻¹), lo que haría de él apto como combustible 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.
- 20
- 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 acetona 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 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 clorohidrinas 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 butanodioles 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 (<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 α-acetolactato sintasa cataliza la condensación de dos moléculas de piruvato dando como resultado una molécula de α-acetolactato y liberando una

molécula de CO₂. El α-acetolactato es convertido entonces en acetoína por medio de una reacción de descarboxilación catalizada por la enzima α-acetolactato descarboxilasa. Finalmente, la acetoína es reducida a 2,3-BDO por la enzima acetoína 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 15 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 25 económico 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 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 láctico *Lactococcus lactis* aparece como un posible candidato.

- 30 35 *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 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.

- 40 *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 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.

- 45 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 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 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 nisinina, para inducir una expresión génica aumentada, o la hemina y el Fe³⁺, para sustentar el crecimiento. En cualquier caso, los medios de 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, 10 especialmente acetoína y ácido láctico, dependiendo de las condiciones de cultivo utilizadas.

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, 15 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.

La presente invención proporciona una cepa bacteriana de *L. lactis* 43103, perteneciente a la clase GR-1, que muestra 20 una elevada capacidad de producción de metabolitos como el 2,3-BDO, la acetoína 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.

Tal y como se ilustra más abajo, la cepa de la invención muestra ser altamente eficiente y específica en la producción 25 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, acetoína 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 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 1

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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína y una capacidad reducida de producción de ácido láctico y la otra tiene una capacidad 5 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.
10

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 15 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 acetoína de como mínimo 10 veces con respecto a la cepa silvestre.

20 En otro ejemplo, la bacteria posee, en condiciones de cultivo aeróbicas, una capacidad incrementada de producción de acetoína 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 como mínimo 10 veces con respecto a la cepa silvestre.
25

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

30 En otro ejemplo, 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 de la procede, y posee una capacidad reducida de producción de ácido láctico 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 35 de 2,3 butanodiol de como mínimo 20 veces con respecto a la cepa silvestre de la procede, y posee una capacidad reducida de producción de ácido láctico de como 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.

40 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
45 (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.

50 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
55 (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 60 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
- 5 (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).

10 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.

15 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.

25 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, 30 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 acetoína que comprende la fermentación aeróbica de un medio rico en carbohidratos por la cepa bacteriana *L. lactis* 43103 de la invención.

35 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, 40 el producto mayoritario de la fermentación es la acetoína. 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 acetoína en una cantidad correspondiente del 45 al 95%, preferentemente, del 65 al 80%, de los productos de 45 fermentación.

En una realización particular, el método de producción de acetoína 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);
- 50 (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 acetoína comprende, adicionalmente, una etapa de purificación de la acetoína 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.

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

La acetoína 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 acetoína, 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.

35

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.

40

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

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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína 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 acetoína 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, aquélla 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 15 referencia a una fermentación en un ambiente anaeróbico, es decir, falto de oxígeno. La fermentación, en un sentido amplio, es un proceso metabólico que convierte carbohidratos en diversos bioproductos.

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 20 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.

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 25 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 30 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* 35 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", 40 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.

45 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 50 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*) 55 en un fermentador de laboratorio equipado con un reactor de 1 L contenido 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 60 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, acetona, 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, H₂SO₄ 0,01 N; flujo, 0,7 mL/min; temperatura de la columna, 55 °C; temperatura del detector, 10 35 °C. La cuantificación de los picos se realizó por medio de un detector de índice de refracción.

Medida del crecimiento bacteriano: El crecimiento bacteriano en medio YEC se estimó mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) 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.

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 20 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 □L del mutágeno químico metanosulfonato de etilo 25 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.

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 30 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.

Se analizaron alrededor de 26.000 colonias. Del análisis se obtuvieron únicamente cuatro colonias de color rojo/pardo 35 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.

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 45 14000 rpm durante 5 min. Las células se lavaron tres veces en medio PM (*Protoplasting Medium*: Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), CaCl₂ 20 mM y sacarosa 0,5 M) y se resuspendieron finalmente en 650 □L 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.

50 Una alícuota de 100 □L 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.

En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se mezclaron 50 □L de las suspensiones de protoplastos de las cepas B4 (inactivados térmicamente) y B3 (no inactivados), se les añadió a continuación 900 □L 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 55 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 contenido 5 mL de medio RM (*Regeneration Medium*: glucosa 1%, extracto de levadura 5 g/L, ácido cítrico 20 mM (pH 7,0), MgCl₂ 25 mM, CaCl₂ 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.

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 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 ₆₀₀	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

20 Se utilizó la cepa *L. lactis* 43103 para llevar a cabo una serie de fermentaciones aeróbicas de un medio rico en 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

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 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.

35 **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 ¹	V. agit. ²	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.

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

²V. 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.

25

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.

35

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.
 10 J. 2010, vol. 5, pp. 274-284
 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
 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, pp. 3967-71
 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
(d) Separación de las células del caldo fermentado resultante de la etapa c).
15
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]