



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 370 947**

② Número de solicitud: 200931258

⑤ Int. Cl.:
C12N 1/06 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)
C12N 15/78 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **23.12.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
26.12.2011

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Martínez López, Virginia;**
Díaz Fernández, Eduardo;
García González, Pedro;
García López, José Luis;
Duque Martín de Oliva, Estrella;
Ramos Martín, Juan Luis y
Prieto Jiménez, María Auxiliadora

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Sistema de autólisis celular para el procesado de la biomasa bacteriana en la producción de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida* KT2440.**

⑤ Resumen:

Sistema de autólisis celular para el procesado de la biomasa bacteriana en la producción de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida* KT2440.

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende la secuencia nucleotídica que codifica la enzima lítica de pared celular endolisina Ejl, la secuencia nucleotídica que codifica la holina Ejh, y una secuencia nucleotídica que codifica un sistema de regulación génica, que a su vez comprende una secuencia nucleotídica promotora de la expresión génica, y una secuencia nucleotídica que codifica y expresa una proteína reguladora de dicha expresión génica. Preferiblemente la cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7659. Además, la presente invención también se refiere a dicha cepa donde el microorganismo *Pseudomonas putida* KT2440 es mutante en uno o más de los genes *tol-pal*. Preferiblemente dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7658. Además, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las cepas descritas para la extracción de polihidroxialcanoato (PHA) sintetizado por dicha bacteria así como a un método para la extracción de dicho compuesto.

ES 2 370 947 A1

DESCRIPCIÓN

Sistema de autólisis celular para el procesamiento de la biomasa bacteriana en la producción de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida* KT2440.

Estado de la técnica anterior

La tecnología de los bioprocesos ha experimentado en los últimos años un avance considerable tratando de mejorar y adaptar la moderna biotecnología a las tecnologías clásicas de fermentación. En este sentido, la tecnología del DNA recombinante o, en un concepto más amplio, las técnicas de biología molecular, han sido determinantes para que se pueda explotar y manipular un gran número de organismos para la producción de compuestos de interés. En gran medida, este éxito ha sido posible gracias al desarrollo de sistemas de expresión de genes en organismos heterólogos más fáciles de manipular y multiplicar. Dentro de las diferentes opciones que se pueden estudiar, cabe destacar aquellas que no sólo pretenden la expresión de un gen o conjunto de genes sino que, además, tratan de facilitar la obtención de un producto de interés biotecnológico y de alto valor añadido, como son los biopolímeros plásticos o bioplásticos. Sin embargo, el uso de este tipo de biopolímeros no se ha implantado hasta ahora en el mercado de forma competitiva debido al bajo coste que aún mantiene la síntesis de los polímeros plásticos derivados del petróleo (Prieto *et al.* 2007. *Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates*. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer, 397-428). Actualmente, como consecuencia del problema de contaminación medioambiental que ha generado el uso del plástico convencional y el incremento del precio del petróleo, se está haciendo una apuesta clara por la implantación de procesos de tipo sostenible para la obtención de energía y la producción de materiales de alto consumo como son los biopolímeros plásticos, y en particular los polihidroxicanoatos (PHAs) (Gavrilescu *et al.* (2005). *Biotechnology Advances*, 23: 471-499).

Los PHAs, conocidos comúnmente como “bioplásticos”, son polímeros biodegradables producidos por ciertas bacterias, que se acumulan en el interior celular en forma de gránulos de reserva de carbono cuando las condiciones de cultivo no son óptimas para el crecimiento (Madison y Huisman, 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 21-53; Prieto *et al.* 2007. *Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates*. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer, 397-428). Estos biopolímeros son biodegradables y las bacterias los sintetizan a partir de fuentes renovables como por ejemplo la glucosa, la fructosa o los ácidos grasos que forman parte de los aceites vegetales. Por tanto, se puede definir el término bioplástico como biopolímero sintetizado a partir de fuentes renovables, que puede ser biodegradado en condiciones controladas y que presenta características físico-químicas similares a los plásticos derivados de la industria petroquímica (Sarasa *et al.* 2009. *Bioresour. Technol.* 100: 3764-3768).

En general, los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster (93-97% del peso seco del gránulo [PSG]) rodeado por fosfolípidos (1-6% del PSG) y proteínas asociadas al gránulo (GAPs) (1-2% del PSG), las cuales forman una fina capa en la superficie del gránulo (Steinbüchel *et al.* 1995. *Can. J. Microbiol.*, 41: 94-105). Hasta el momento se han definido tres clases de GAPs en bacterias: i) las PHA sintasas, involucradas en la polimerización del PHA, ii) las PHA despolimerasas, responsables de la degradación del bioplástico y iii) las fasinas, las GAPs más abundantes, con una función estructural o reguladora (Prieto *et al.* 1999a. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3265-3271; Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212).

Los PHAs se clasifican en dos tipos principales de acuerdo a su estructura química: los PHAs de cadena corta (sc-PHAs) obtenidos a partir de monómeros con 4 o 5 átomos de carbono y los de cadena media (mc-PHAs) procedentes de monómeros con 6 a 14 átomos de carbono. Los diferentes PHAs identificados hasta la fecha son polímeros lineales compuestos de 3-hidroxiácidos grasos exclusivamente de la configuración *R* (RHAs). El peso molecular de estos polímeros varía entre 50.000-1.000.000 y su diversidad radica en las sustituciones en el carbono asimétrico en posición 3, que le confiere al polímero el carácter quiral (Prieto *et al.* (1999b) *J. Bacteriol.* 181: 858-868).

Es conocido que la composición del polímero depende de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo utilizado durante la fermentación de la bacteria productora (Durner, *et al.* 2001. *Biotechnol. Bioeng.*, 72: 278-288, Jung *et al.* 2001. *Biotechnol. Bioeng.*, 72: 19-24). Por otra parte, es importante resaltar que las características físico-químicas de los polímeros varían según la naturaleza química de los monómeros que los componen (Madison y Huisman, 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 21-53; Kessler *et al.*, 2001. *J. Biotechnol.*, 86: 97-104). Teniendo en cuenta que se han descrito más de 140 RHAs diferentes como componentes de los PHAs producidos por bacterias (Steinbüchel *et al.* 1995. *Can. J. Microbiol.*, 41: 94-105; Sudesh *et al.* 2000. *Prog. Polym. Sci.*, 25: 1503-1555), y que el biopolímero después de su obtención por fermentación puede ser sometido a posteriores modificaciones químicas, como a su entrecruzamiento y a la adición de grupos funcionales (Lageveen, R. G. *et al.*, 1988. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2924-2932.), es fácil imaginar la gran diversidad de bioplásticos y RHAs diferentes que pueden generarse mediante la combinación de todos estos procesos. Es importante señalar que los PHAs también pueden ser útiles para aplicaciones biomédicas como biomateriales (Zinn *et al.* 2001. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 53: 5-21). Además, el PHA puede ser considerado como una fuente de nuevos compuestos quirales (sintones) de gran utilidad como precursores en la industria farmacéutica, ya que son difíciles de conseguir en estado puro mediante procesos químicos convencionales.

En la producción de los PHAs mediante fermentación bacteriana, el proceso de extracción de los mismos es probablemente el paso más importante desde el punto de vista del ahorro de costes de producción y del desarrollo de un

proceso de fabricación respetuoso con el medio ambiente. Hasta ahora se han desarrollado diferentes métodos para extraer el PHA de las bacterias productoras pero en su mayoría requieren el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, cócteles enzimáticos o detergentes (Elbahloul Y, Steinbüchel A, 2009. *Appl Environ Microbiol.*, 75: 643-51).

5 Por otra parte, la mayoría de los bacteriófagos (o fagos abreviadamente), con excepción de los filamentosos, son líticos y rompen la pared de la bacteria huésped hasta su lisis completa. Aunque hay más de una estrategia para llevar a cabo este proceso, la gran mayoría de los fagos se valen de dos proteínas que actúan de manera perfectamente coordinada: una holina y una endolisina. Los genes que codifican estas proteínas suelen estar contiguos y su transcripción y traducción es tardía, iniciándose sólo cuando los viriones están en su última fase de empaquetamiento dentro del citoplasma bacteriano. Las holinas constituyen un grupo de proteínas fágicas de estructura primaria muy variada pero que se agrupan en tres clases y funcionalmente son muy similares en su modo de acción. Son proteínas pequeñas, con dominios transmembranales que se localizan en la membrana citoplásmica formando un poro o agujero (“hole”) que en un momento genéticamente programado permite el paso de la enzima lítica (endolisina) encargada de romper la pared bacteriana y provocar la lisis (Wang *et al.* (2000) *Annu. Rev. Microbiol* 54: 799-825). Las endolisinas son enzimas líticas codificadas por los fagos, no tienen péptido señal de secreción, se acumulan en el citoplasma durante el ciclo vegetativo y se translocan a la pared celular a través del poro formado por la oligomerización de la holina. Una vez en la pared celular, se unen al peptidoglicano, rompen enlaces específicos y desencadenan la lisis bacteriana y la posterior liberación de la progenie fágica. Dependiendo del tipo de enlace que hidrolizan, las endolisinas pueden ser muramidasa, glucosaminidasa, transglicosilasa, amidasa o endopeptidasa (Hermoso *et al.* (2007) *Curr. Op. Microbiol.* 10: 461-472).

Por otra parte, el complejo Tol-Pal de las bacterias está organizado en dos complejos proteicos: un complejo de la membrana interna que consiste en las proteínas TolQ, TolA y TolR que interactúan entre ellas mediante dominios transmembrana, y otro complejo asociado a la membrana externa compuesto por las proteínas TolB y Pal, que también interactúan con Lpp, OmpA y el peptidoglicano (Lazzaroni *et al.* 1999. *FEMS Microbiol. Lett.*, 177: 191-197). Estas proteínas se localizan formando complejos en la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas, y son críticas para el mantenimiento de la estructura de la envuelta. La alteración de las mismas, conduce a situaciones de debilitamiento de la célula e incrementada sensibilidad a detergentes o agentes quelantes (Llamas *et al.* 2000. *J. Bacteriol.*, 182: 4764-772).

Es conocido que la extracción de los polihidroxicanoatos producidos por una bacteria puede hacerse directamente sin lisar previamente la bacteria mediante el empleo de solventes orgánicos a elevada temperatura. Sin embargo este proceso es peligroso, energéticamente poco eficiente y medioambientalmente muy contaminante. Por este motivo para liberar los gránulos de bioplástico antes de su extracción se recurre también a la lisis previa de la bacteria mediante procedimientos físicos de ruptura de las células bacterianas o mediante procedimientos químicos de lisis celular con la ayuda de detergentes. Sin embargo, los procedimientos físicos de ruptura requieren del empleo de un equipamiento complejo y costoso además de un gasto de energía, y los procedimientos químicos necesitan del uso de altas cantidades de detergente que son medioambientalmente contaminantes. Por consiguiente un objetivo de esta invención consistió en desarrollar un procedimiento de lisis celular confiriendo nuevas propiedades a los microorganismos productores del polihidroxicanoato de tal manera que la extracción de estos compuestos fuera menos costosa energéticamente y medioambientalmente menos contaminante.

La complejidad de los procesos de extracción resultantes de la fermentación de las bacterias supone un obstáculo a la hora de reducir tanto los costes de producción como la contaminación medioambiental a la hora de escalar el proceso a nivel industrial. Por todo ello, el desarrollo de nuevos métodos o procesos para la producción y extracción de PHAs de las bacterias de forma competitiva y ecológica, se ha convertido en un objetivo fundamental para esta actividad industrial.

50 Explicación de la invención

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende la secuencia nucleotídica que codifica la enzima lítica de pared celular endolisina Ejl, la secuencia nucleotídica que codifica la holina Ejh, y una secuencia nucleotídica que codifica un sistema de regulación génica, que a su vez comprende una secuencia nucleotídica promotora de la expresión génica, y una secuencia nucleotídica que codifica y expresa una proteína reguladora de dicha expresión génica. Preferiblemente la cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7659. Además, la presente invención también se refiere a dicha cepa donde el microorganismo *Pseudomonas putida* KT2440 es mutante en uno o más de los genes *tol-pal*. Preferiblemente dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7658. Además, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las cepas descritas para la extracción de polihidroxicanoato (PHA) sintetizado por dicha bacteria así como a un método para la extracción de dicho compuesto.

En la presente invención, se ofrece una solución a la extracción de compuestos producidos por la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440, y particularmente la extracción de polihidroxicanoatos disminuyendo con ello el uso de productos químicos contaminantes utilizados para lisar las células productoras. En los ejemplos de la presente invención se muestran los resultados de la autólisis celular en dos cepas bacterianas depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las dos cepas comprenden un sistema genético heterólogo lítico que expresa genes impli-

ES 2 370 947 A1

cados en la degradación de la pared celular y en la permeabilidad de la membrana celular, cuya expresión se encuentra controlada por un sistema regulador de la expresión dependiente de un inductor.

5 Es conocido que cuando las células bacterianas portan un sistema genético heterólogo lítico en multicopia, principalmente en forma de plásmido, las células se hacen muy inestables porque se lisan incluso en ausencia de inductor, crecen poco y lo hacen lentamente, y por lo tanto son poco útiles para la producción de sustancias de interés. Por consiguiente, una parte de esta invención consistió en estudiar el comportamiento de estas cepas cuando portan este sistema genético heterólogo lítico en una única copia integrada en el cromosoma. En este caso el comportamiento de la cepa bacteriana no se conocía y por consiguiente no se podía predecir con exactitud el resultado. Al reducir el número de copias del sistema lítico podría esperarse que el sistema lítico se volviese menos agresivo para la célula y por lo tanto la célula fuese más estable. Pero también podría esperarse que la célula no se lisara y por consiguiente el sistema fuese inservible para el objetivo propuesto. Al mismo tiempo, dada la naturaleza heteróloga del sistema y teniendo en cuenta que podría insertarse en cualquier parte del cromosoma, también podría esperarse que aun reduciendo a una sola copia el número de copias del sistema lítico heterólogo, la célula fuese igualmente inestable.

En el caso de esta invención las dos cepas anteriormente descritas y depositadas en la CECT portan el sistema genético heterólogo lítico en monocopia.

20 Dentro de las distintas opciones de comportamiento que cabría esperar se observó que la cepa recombinante CECT 7659 que portaba el sistema genético heterólogo lítico en monocopia era más estable que la cepa nativa transformada con el plásmido que portaba el sistema lítico en multicopia.

25 Es conocido que las mutaciones en los genes *tol-pal* causan inestabilidad de la membrana celular externa en la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 y permite que las proteínas periplásmicas se secreten y la bacteria se lise en presencia de algunos detergentes y EDTA. Por ello se pensó que esta mutación podría ser útil para inducir la lisis por detergente y EDTA en las células productoras de PHAs. Sin embargo, la presencia de PHA en lugar de desestabilizar la célula mutante en los genes *tol-pal* hacía que la célula fuese más estable e insensible a la lisis por el detergente y el agente quelante EDTA. Por lo tanto dicha mutación resultaba inservible para el objetivo propuesto.

30 Aunque la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 mutante en los genes *tol-pal* no resultaba ser útil individualmente para el objetivo propuesto, se analizó si la combinación de este sistema de lisis de la cepa mutante en los genes *tol-pal* con el sistema genético heterólogo lítico en monocopia de la presente invención, generaba algún efecto sinérgico inesperado que propiciara la lisis celular en las condiciones deseadas. Por este motivo se construyó una cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 y en concreto la cepa recombinante CECT 7658 que portaba el sistema genético heterólogo lítico en monocopia en la cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 mutante en uno de los genes *tol-pal*. De forma inesperada en esta nueva cepa recombinante se consiguió mejorar la lisis de forma controlada y por lo tanto se mejoró el proceso de extracción de los compuestos producidos, y en concreto la extracción del PHA.

35 Las razones precisas que explican este comportamiento son aun desconocidas, pero se puede especular con la posibilidad de que dicha mutación *tol-pal* provoca un debilitamiento de la membrana celular externa, que en condiciones normales no es suficiente para inducir la lisis, pero que en presencia del sistema genético herterólogo en monocopia, que por si solo tampoco es capaz de inducir la lisis, complementa de forma sinérgica la acción de este último sobre la pared celular y la membrana celular interna. De esta manera, en presencia de ambos sistemas y tras la adición de un inductor, de una pequeña cantidad de un detergente y de un agente químico quelante, la lisis se produce de forma más rápida y contundente, y además de forma controlada por el inductor. Se genera así un efecto sinérgico de tipo umbral, *a priori* imprevisible, de tal manera que hasta que no se combinan todos los elementos de forma precisa no se supera el umbral de desestructuración de la envoltura celular necesario para la lisis y por lo tanto la célula permanece perfectamente viable. En estas condiciones, la liberación de los compuestos contenidos en el citoplasma celular se produce con una alta eficiencia en presencia de un detergente y un agente quelante sólo cuando se induce el sistema genético heterólogo lítico en monocopia convirtiéndose así la nueva cepa recombinante creada (CECT 7658) en un nuevo organismo muy útil para el objetivo propuesto.

55 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende la secuencia nucleotídica que codifica una enzima lítica de pared celular, la secuencia nucleotídica que codifica una holina, y un sistema regulador de la expresión génica.

60 La enzima lítica de pared celular es una proteína capaz de romper la pared de la célula o las sustancias que componen dicha pared. Dicha enzima lítica puede proceder de bacterias, hongos, levaduras, plantas, animales o bacteriófagos. Preferiblemente la enzima lítica de pared celular se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, Ejl del bacteriófago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*, Cpl-1 del bacteriófago Cp-1 de *Streptococcus pneumoniae*, transglucosidasa R del bacteriófago λ de *Escherichia coli*, lisozimas del bacteriófago P22 de *Salmonella* y del bacteriófago T4 de *Escherichia coli*, proteína E del bacteriófago ϕ X174 de *E. coli*, transglucosidasa Slt y amidasa AmiA de *Escherichia coli* (Young, R. 1992. Microbiol. Rev. 56:430-481).

ES 2 370 947 A1

La holina es una proteína fágica con dominios transmembranales que se localiza en la membrana citoplásmica formando un poro que permite el paso de la enzima lítica encargada de romper la pared bacteriana y provocar la lisis. Las holinas tienen una estructura primaria muy variada pero se agrupan en tres clases y funcionalmente son muy similares en su modo de acción. Dicha holina procede de un bacteriófago. Preferiblemente dicha holina se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, Ejh del bacteriófago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*, Cph-1 del bacteriófago Cp-1 de *Streptococcus pneumoniae*, holina del bacteriófago ø6 de *Pseudomonas phaseolicola*, holina S del bacteriófago λ de *Escherichia coli*, holina del bacteriófago P22 de *Salmonella* (Young, R. 1992. Microbiol. Rev. 56:430-481).

10 La clasificación científica de la bacteria de la presente invención es: Reino: *Bacteria*/División: *Proteobacteria*/Orden: *Pseudomonadales*/Familia: *Pseudomonadaceae*/Género: *Pseudomonas*/Especie: *Pseudomonas putida*.

15 La secuencia completa del genoma de *Pseudomonas putida* KT2440 ha sido divulgada por Nelson *et al.*, (2002) (Nelson *et al.*, 2002. *Environ Microbiol.*, 4(12): 799-808). El N° de acceso de la secuencia completa de *Pseudomonas putida* KT2440 es AE015451.1 y su identificación taxonómica (*Taxonomy ID*) es 160488.

20 El término “sistema genético heterólogo lítico” se refiere a una construcción genética que comprende secuencias nucleotídicas que corresponden a uno o más organismos diferentes de *Pseudomonas putida*. Por ejemplo, pero sin limitarse, la enzima lítica de pared celular y la holina pueden ser las secuencias nucleotídicas que codifican la secuencia aminoacídica de las proteínas que tienen dicha actividad, procedentes de fagos de *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus megaterium*. Preferiblemente dichas secuencias proceden del fago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*.

25 El término “sistema de regulación de la expresión génica” se refiere a un conjunto de secuencias nucleotídicas que regulan la expresión del “sistema genético heterólogo lítico” y pueden ser heterólogas o no, es decir, dichas secuencias pueden proceder o no de *Pseudomonas putida*. Es decir, dicho término hace referencia a un conjunto de secuencias nucleotídicas que tenga efecto sobre la funcionalidad de una secuencia nucleotídica respecto del comienzo de la transcripción o al inicio de traducción de una secuencia de ARN u otras secuencias. A modo de ejemplo, entre los sistemas reguladores de la expresión génica se encuentran los que se denominan sistemas reguladores inducibles que están constituidos por una o más secuencias nucleotídicas denominadas promotoras/operadoras y por una o más secuencias nucleotídicas que codifican y expresan una o más proteínas reguladoras que activan o reprimen la expresión génica en presencia de uno o más compuestos denominados inductores. Un ejemplo de activador de la expresión génica es la proteína XylS de *Pseudomonas putida* que pertenece a una familia de reguladores transcripcionales denominada XylS/AraC, implicadas en la estimulación de la transcripción de al menos 90 proteínas diferentes implicados en diferentes procesos celulares como el metabolismo del carbono, patogénesis y la respuesta ante agentes alquilantes en bacterias. Preferiblemente la proteína reguladora de la expresión génica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, cualquier proteína que pueda actuar como regulador de la expresión génica en *Pseudomonas putida*.

30 Una realización preferida se refiere a la cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico, donde la enzima lítica de pared celular es la endolisina Ejl, la holina es la proteína Ejh, y el sistema regulador de la expresión génica es *xyl/Pm*. Las secuencias nucleotídicas que codifican la endolisina Ejl y la holina Ejh, pueden proceder, por ejemplo, pero sin limitarse, de fagos de *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus megaterium*. Preferiblemente dichas secuencias proceden del fago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*. Dichas secuencias nucleotídicas pueden formar parte de un casete en el que la secuencia de *ejl* precede a la secuencia *ejh*, en el sentido 5' a 3'. La secuencia reguladora de la expresión génica, *xyl/Pm*, consiste en una secuencia nucleotídica que codifica y expresa la proteína XylS, un regulador de la transcripción del promotor del plásmido TOL que regula la expresión del promotor *Pm* de la ruta de degradación *meta*. La proteína XylS pertenece a la familia de reguladores de la transcripción XylS/AraC. En consonancia con la organización estructural de la proteína XylS, *Pm* tiene dos motivos llamados A y B, cuyas secuencias son TGCA y GGNTA, respectivamente. Estos motivos se repiten en el promotor *Pm* y como consecuencia los monómeros de la proteína XylS se unen a dichas repeticiones, activando la transcripción. Para la activación de la transcripción de la secuencia nucleotídica que quede aguas abajo de *xyl/Pm* es necesario el uso de un activador como por ejemplo, pero sin limitarse, el ácido 3-metilbenzoico (en lo sucesivo 3-MB).

35 El sistema genético heterólogo lítico descrito en párrafos anteriores puede comprender además un marcador de resistencia que permita la selección de las bacterias que contienen dicho sistema. El uso de genes de resistencia antibiótica es una herramienta importante en la ingeniería genética en general. Los genes de resistencia a los antibióticos tienen la habilidad de desactivar selectivamente ciertos antibióticos y, en consecuencia, proteger las células contra esos antibióticos. Un gen de resistencia antibiótica, por tanto, puede ser utilizado para delatar la existencia del sistema genético heterólogo lítico de la presente invención. En la práctica, el gen antibiótico es ligado a dicho sistema antes de ser transformado en la célula bacteriana receptora. Estas células son entonces incubadas en presencia del antibiótico. Sólo las células que se reproduzcan en estas condiciones son las que habrán incorporado el gen de resistencia al antibiótico junto con dicho sistema genético. Preferiblemente el marcador confiere resistencia a las células frente al antibiótico kanamicina. Además, el marcador puede conferir resistencia contra productos químicos o frente a la presencia de nutrientes no usuales.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a cualquier cepa bacteriana derivada de *Pseudomonas putida* KT2440, descrita en párrafos anteriores, donde dicha cepa es el microorganismo con número de depó-

ES 2 370 947 A1

sito CECT 7659. Dicho microorganismo ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos tipo (CECT) el día 16 de diciembre de 2009 le correspondió el nº de depósito CECT 7659. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia/Edificio de investigación/Campus de Burjassot/46100 Burjassot (Valencia).

5 La cepa CECT 7659 comprende un sistema genético heterólogo lítico. Esta cepa posee integrados en el cromosoma los genes *ejh* y *ejl* que codifican una holina (Ejh) y una enzima lítica (Ejl) del bacteriófago EJ-1, respectivamente, bajo el control transcripcional del promotor *Pm* (cassette *ejh-ejl*, construcción reguladora *xylS/Pm* y un gen de resistencia a la kanamicina). La secuencia nucleotídica que codifica para la holina Ejh es SEQ ID NO: 1 y la secuencia que codifica para la endolisina Ejl es SEO ID NO: 2 (casete *ejh-ejl*; Número de acceso NC_005294.1), y la secuencia nucleotídica de los componentes del sistema regulador de la expresión génica *xyl/Pm* es SEQ ID NO: 5 para Xyl (Número de acceso NP_542858) y SEQ ID NO: 6 para Pm (Número de acceso X01103). En adelante, para referirse a dicha cepa CECT 7659 puede emplearse de forma indistinta el término KTHL.

15 Las condiciones de cultivo y de mantenimiento de la cepa CECT 7659, comunicadas a la Autoridad Internacional de depósito, son:

Condiciones de cultivo

20 Crecimiento en medio rico LB (número 48 de medios de la CECT) suplido con kanamicina 50 µg/ml. Incubar en un agitador orbital a 300 rpm y a 30°C.

Condiciones de mantenimiento

25 Crecer en medio rico LB suplido con kanamicina 50 µg/ml durante 14 h en agitación a 30°C y guardar la cepa a - 80°C con glicerol 15%.

30 Otra realización preferida se refiere a cualquier cepa derivada de la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 que comprende dicho sistema heterólogo lítico, donde dicha cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, descrita en párrafos anteriores, es mutante en uno o más de los genes *tol-pal*. El término “mutante” tal como se emplea en la presente invención se refiere a la secuencia resultante de la delección de los genes *tol-pal*. La célula de *Pseudomonas putida* KT2440 mutante en al menos uno o más de los genes *tol-pal* se selecciona de la lista que comprende *Pseudomonas putida* KT2440 AX (*tolA::xylE* que genera una proteína TolA acortada a 94 aminoácidos), *Pseudomonas putida* KT2440 BX (*tolB::xylE* que genera una proteína TolB acortada a 29 aminoácidos), *Pseudomonas putida* KT2440 QX (*tolQ::xylE* que genera una proteína TolQ acortada a 17 aminoácidos) o *Pseudomonas putida* KT2440 RX (*tolR::xylE* que no genera una proteína TolR porque el gen *tolR* está delecionado).

40 Una realización más preferida se refiere a la cepa descrita en el párrafo anterior, mutante en uno o más de los genes *tol-pal*, donde dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7658. La cepa CECT 7658 corresponde a la cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 BX (*tolB::xylE* que genera una proteína TolB acortada a 29 aminoácidos). Dicha cepa posee mutado el gen que codifica la proteína TolB del sistema Tol-Pal (*P. putida* KT2440 *tolB::xylE*, con TolB acortado a 29 aminoácidos). Además, posee integrados en el cromosoma los genes *ejh* y *ejl* que codifican una holina (Ejh) y una enzima lítica (Ejl) del bacteriófago EJ-1, respectivamente, bajo el control transcripcional del promotor *Pm* (cassette *ejh-ejl*, construcción reguladora *xylS/Pm* y un gen de resistencia a la kanamicina). Es decir, la cepa CECT 7658 además de presentar la mutación de los genes *tol-pal* comprende el sistema genético heterólogo lítico donde la secuencia nucleotídica que codifica para la holina Ejh es SEQ ID NO: 1, la secuencia que codifica para la endolisina Ejl (casete *ejh-ejl*) es SEQ ID NO: 2, y la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia reguladora de la expresión génica *xyl/Pm* es SEQ ID NO: 5 para Xyl y SEQ ID NO: 6 para Pm. En adelante, para referirse a dicha cepa CECT 7658 puede emplearse de forma indistinta el término BXHL. Dicho microorganismo ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos tipo (CECT) el día 16 de diciembre de 2009 y le correspondió el nº de depósito CECT 7658. En adelante, para referirse a dicha cepa CECT 7658 puede emplearse de forma indistinta el término BXHL.

55 Las condiciones de cultivo y de mantenimiento de la cepa CECT 7658, comunicadas a la Autoridad Internacional de depósito, son:

Condiciones de crecimiento

60 Crecimiento en medio rico LB (número 48 de medios de la CECT) suplido con kanamicina 50 µg/ml. Incubar en un agitador orbital a 300 rpm y a 30°C.

Condiciones de mantenimiento

65 Crecer en medio rico LB suplido con kanamicina 50 µg/ml durante 14 h en agitación a 30°C y guardar la cepa a - 80°C con glicerol 15%.

El sistema genético heterólogo lítico se consigue introducir en las células mediante la transformación de vectores que contienen dicho sistema genético. La transformación puede dar lugar a una expresión transitoria de los genes de

ES 2 370 947 A1

interés o a una expresión estable. La expresión estable permite que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada siga expresándose.

5 Otra realización preferida se refiere a cualquier cepa descrita en párrafos anteriores, donde el sistema genético heterólogo lítico está insertado en su ADN cromosómico. Una realización más preferida se refiere a dicha cepa donde el sistema genético heterólogo lítico insertado en su ADN cromosómico se encuentra en una sola copia.

10 Otro aspecto de la presente invención es una población microbiana que comprende cualquier cepa descrita en párrafos anteriores.

10 En adelante, para referirse a cualquier cepa descrita en párrafos anteriores o a la población microbiana que la comprende, se puede usar el término “microorganismo de la presente invención” o “microorganismo de la invención”.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por dicha bacteria. Puesto que la presente invención se centra en la inserción de un sistema genético heterólogo capaz de producir, de forma inducida, la lisis de las células que lo contienen, el microorganismo de la invención puede ser usado para la extracción de cualquier compuesto sintetizado por dicha bacteria. El hecho de que en la presente invención se haya medido la cantidad de PHA sintetizada por dicha bacteria no limita el tipo de compuesto sintetizado por la misma. Una realización preferida se refiere al uso del microorganismo de la invención para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por dicha bacteria, donde el compuesto sintetizado es polihidroxialcanoato (PHA). Cualquier microorganismo de la presente invención puede ser utilizado para la producción de PHA. El PHA producido es extraído de forma eficiente gracias a las características técnicas intrínsecas de cada una de las cepas descritas.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la extracción de PHA sintetizado por el microorganismo de la invención, que comprende:

- a) cultivar el microorganismo de la invención en un medio mínimo de cultivo,
- 30 b) añadir un compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico al cultivo del paso (a), y
- c) aislar el compuesto sintetizado por dicha bacteria.

35 El término “medio mínimo” tal como se emplea en la presente invención se refiere a un medio de cultivo con composición definida de sales minerales y un compuesto que la bacteria *Pseudomonas putida* pueda utilizar como fuente de carbono. Una realización preferida se refiere al uso del medio denominado 0.1 N M63, compuesto por 13.6 g KH_2PO_4 ; 0.2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.5 mg $\text{SO}_4\text{Fe} \times 7 \text{H}_2\text{O}$ por litro, tamponado a pH 7, y suplementado con 1 mM de MgSO_4 y una solución de elementos traza (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212). La fuente de carbono puede ser cualquier compuesto que la bacteria *Pseudomonas putida* pueda utilizar como fuente de carbono. Preferiblemente, pero sin limitarse, cualquier molécula susceptible de ser transformada en hidroxialcanoil-CoA mediante el metabolismo bacteriano. Dicho medio es apropiado para que las células produzcan el compuesto de interés.

45 El “compuesto efector” tal como se emplea en la presente invención se refiere a un compuesto capaz de inducir la expresión de dicho sistema genético por medio del sistema regulador de la expresión génica. Al final de la etapa de crecimiento cuando ya se ha acumulado la suficiente biomasa y la bacteria ha producido el compuesto de interés se induce la expresión del casete con los dos genes líticos mediante la adición al medio de cultivo de dicho compuesto efector. De esta manera la actuación conjunta de la enzima lítica y la holina conduce a la ruptura espontánea de la envoltura celular de la bacteria y la liberación de los compuestos de interés contenidos en el citoplasma celular.

50 El aislamiento del compuesto sintetizado por dicha bacteria, según el paso (c) del método, se lleva a cabo mediante técnicas que forman parte del conocimiento general común y por tanto, están disponibles a un experto en la materia. Por ejemplo, el aislamiento o recuperación del producto enzimático se lleva a cabo por ejemplo, pero sin limitarse, mediante precipitación de dicho producto con fraccionamiento salino, precipitación por calor, precipitación isoeléctrica, con disolventes orgánicos o con polímeros, con acetona fría o mediante cromatografía.

60 Una realización preferida se refiere al método para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por el microorganismo de la invención, donde además comprende un paso previo al paso (a) donde la cepa o población bacteriana se cultiva en un medio rico de cultivo. El término “medio rico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a un medio que contiene extracto de levadura u otras sustancias de composición compleja y poco definida que puedan servir como fuente de nutrientes y energía para el crecimiento del microorganismo. En una realización más preferida el medio rico es Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Rusell, 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

65 Dicho medio rico es apropiado para que las células se dividan pero no produzcan el compuesto de interés. Es decir, el método que se describe en esta realización preferida consiste en las siguientes etapas secuenciales:

ES 2 370 947 A1

- cultivar el microorganismo de la invención un medio rico de cultivo,

- cultivar los microorganismos obtenidos en el paso anterior en un medio mínimo de cultivo. Para ello puede aislarse el microorganismo de la invención o no. Preferiblemente el microorganismo de la invención se aísla por técnicas conocidas por el experto en la materia y se trasvasa a dicho medio mínimo de cultivo,

- añadir un compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico al cultivo del paso anterior,

- añadir compuestos químicos aceleradores de la lisis y

- aislar el compuesto sintetizado por dicha bacteria.

Otra realización preferida se refiere al método para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por el microorganismo de la invención, donde el compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico es el ácido 3-MB.

Otra realización preferida se refiere al método para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por el microorganismo de la invención, donde además, después del cultivo del microorganismo de la invención, se adiciona al medio mínimo de cultivo, uno o más compuestos químicos, con propiedades detergentes y quelantes, en pequeñas cantidades que aceleran la lisis celular mediada por el sistema genético heterólogo lítico, pero que en dichas cantidades no son capaces de producir por sí solos la lisis de una bacteria nativa no modificada mediante el sistema genético heterólogo lítico. Las cantidades de compuestos químicos utilizados como aceleradores de la lisis son mucho más bajas que las cantidades que se necesitarían para lisar la bacteria si ésta no estuviese modificada genéticamente, y por lo tanto son menos contaminantes.

Según otra realización preferida del método para la extracción de PHA, donde además, después del cultivo del microorganismo de la invención, se adiciona un precursor de PHA al medio mínimo de cultivo. Una realización más preferida de la presente invención se refiere al método para la extracción de PHA, donde el precursor de PHA es un ácido graso o cualquier molécula susceptible de ser transformada en hidroxialcanoil-CoA mediante el metabolismo bacteriano.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

Fig. 1. Muestra un esquema de la clonación del casete *ejh-ejl* en el cromosoma de *Pseudomonas putida* KT2440 bajo el control transcripcional del promotor *P_m*.

Fig. 2. Muestra los perfiles de distribución obtenidos por ultracentrifugación con gradiente de sacarosa.

Tubo 1: cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 sin inductor; tubo 2: cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 con inductor; tubo 3: cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL sin inductor; tubo 4: cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL con inductor. La banda blanca localizada en la interfase del gradiente de este último tubo corresponde a los gránulos de PHA liberados al medio extracelular.

Fig. 3. Muestra el recuento de células viables (ufc/ml) a las 0, 6 y 24 h de las cepas *Pseudomonas putida* KTHL y *Pseudomonas putida* BXHL en presencia y ausencia de 3-MB.

Fig. 4. Muestra los perfiles de distribución obtenidos por ultracentrifugación con gradiente de sacarosa.

Tubo 1: cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 incubada con EDTA 10 mM y SDS 0.1%; tubo 2: cepa recombinante *Pseudomonas putida* BXHL con 3-MB incubada con EDTA 10 mM y SDS 0.1%.

Fig. 5. Muestra el contenido intracelular de PHA de la cepa *Pseudomonas putida* BXHL en presencia de 3-MB y en presencia de 3-MB, EDTA 10 mM y SDS 0.1%.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen el uso de la cepa de la invención para la extracción de cualquier compuesto sintetizado

por las cepas de *Pseudomonas putida* KTHL y *Pseudomonas putida* BXHL, mutante en el sistema Tol-pal, portadoras del sistema lítico de la cepa KTHL.

Ejemplo 1

5 *Construcción de la cepa de Pseudomonas putida KTHL y extracción de compuestos (PHA) sintetizados por las mismas*

1.1. *Construcción de la cepa Pseudomonas putida KTHL portadora del casete lítico ejh-ejl en monocopia*

10 Se ha diseñado un sistema de autólisis celular en *Pseudomonas putida* KT2440 mediante la construcción de una cepa portadora en el cromosoma de los genes que codifican una holina (Ejh) y una endolisina (Ejl). La cepa resultante se ha denominado *Pseudomonas putida* KTHL.

15 Para controlar la expresión del sistema lítico en *Pseudomonas putida* KT2440, se construyó un sistema de expresión en monocopia del casete *ejh-ejl* con el fin de introducirlo en el genoma de la cepa mediante conjugación triparental. Para ello, se amplificó por PCR el fragmento de 1.209 pb utilizando el plásmido pEDF12 como molde (Tabla 4) y V08 y V09 como oligonucleótidos (Tabla 5). Dicho fragmento se digirió con *Xba*I y *Bam*HI y tras clonarlo en el plásmido pUC18Not se clonó en pCNB1 originando el plásmido pCNBHL (Fig. 1). Mediante conjugación triparental con la cepa CC118 λ pir (pCNBHL) se insertó en el cromosoma de *Pseudomonas putida* KT2440 un fragmento de
20 DNA conteniendo el casete *ejh-ejl*, la construcción reguladora *xylS/Pm* y un gen de resistencia a la kanamicina, dando lugar a la cepa *Pseudomonas putida* KTHL.

1.2. *Cuantificación de la eficacia del sistema de lisis mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa para el aislamiento del gránulo (PHA)*

25 Una vez finalizada la fermentación, las células de *Pseudomonas putida* KTHL se centrifugaron a $31.000 \times g$ durante 1 h en una centrifuga Sorvall y los sedimentos se resuspendieron en tampón fosfato pH 8 para preservar la integridad celular. El 50% de cada muestra se liofilizó y se analizó por GC-MS para cuantificar el contenido total en PHA. El resto de la muestra se sometió a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa preformado con un primer volumen de sacarosa al 20% (11 ml) y un segundo volumen de sacarosa al 15% (11 ml). Las muestras se colocaron en la parte superior del gradiente y se ultracentrifugaron a $126.000 \times g$ durante 20 h en una ultracentrífuga XL-90 (Beckman). Los extractos se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso (Moldes *et al*, 2004). Tras esta ultracentrifugación, se recogió con pipeta Pasteur la banda blanca que aparece en el tercio superior del tubo; se observó al microscopio, se liofilizó y se analizó por GC-MS para determinar el contenido en PHA. Para cuantificar la cantidad de PHA presente en el interior celular, se recuperó el sedimento resultante de la ultracentrifugación, se liofilizó y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se cuantificó también el número de células viables (unidades formadoras de colonias por mililitro, ufc/ml) y la biomasa (gramos de PHA por litro, g/l). Todas las centrifugaciones y ultracentrifugaciones se llevaron a cabo a 4°C.

1.3. *Estudio del comportamiento de la cepa Pseudomonas putida KTHL*

40 Para estudiar el efecto de la expresión de los genes líticos en el crecimiento y la integridad celular de *Pseudomonas putida* KTHL, se siguieron dos protocolos de crecimiento diferentes: i) crecimiento en una fase: la cepa se creció en un solo paso en condiciones de producción de PHA. Para ello, *Pseudomonas putida* KTHL y su cepa parental, *Pseudomonas putida* KT2440 se cultivaron en LB durante 14 h. Tras ese tiempo se lavaron con solución salina y se inocularon a DO₆₀₀ 0,3 en 100 ml de M63 0,1 N con octanoato 15 mM como única fuente de carbono y con el inductor (3-MB, 5 mM); ii) crecimiento en dos fases: Se inocularon 50 ml de LB a DO₆₀₀ 0,3 con preinóculos de ambas cepas. Después de 14 h de incubación los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en 100 ml de M63 0,1 N con octanoato 15 mM como única fuente de carbono y con el inductor (3-MB, 5 mM). Los cultivos se incubaron durante 23 h.

50 El crecimiento de las distintas cepas en condiciones de producción de plástico en una sola fase fermentativa permite crecer a partir de una única fuente de carbono (ácido octanoico) y alcanzar un alto rendimiento biomasa/PHA.

55 Antes de analizar la expresión de los genes líticos en *Pseudomonas putida* KTHL, se comprobó la capacidad de dicha cepa para crecer y producir PHA en un medio mínimo limitado en nitrógeno, con ácido octanoico como única fuente de carbono. *Pseudomonas putida* KTHL es capaz de crecer y acumular PHA en esas condiciones fermentativas a niveles de DO₆₀₀ similares a los de la cepa salvaje (Tabla 1). Este resultado fue confirmado mediante la cuantificación por GC-MS del contenido intracelular de PHA en las dos cepas. Esto demostró que la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL acumula similar a la producida por la cepa salvaje en las condiciones de crecimiento probadas (Tabla 1).
60

65 Cuando el inductor del sistema lítico (3-MB) está presente en el medio de cultivo se observó una inhibición en el crecimiento a niveles de DO₆₀₀ de *Pseudomonas putida* KTHL, que no se observó en la cepa salvaje bajo las mismas condiciones. Estos resultados se confirmaron mediante la estimación de la viabilidad celular (ufc/ml) y de la biomasa (g/l) de la cepa salvaje y de la cepa recombinante sin y con 3-MB (Tabla 1).

ES 2 370 947 A1

TABLA 1

Muestra el valor de densidad óptica ($\Delta_{600 \text{ nm}}$); el contenido intracelular de PHA; el recuento de células viables (ufc/ml) y la biomasa (g/l) correspondientes a células crecidas en una fase fermentativa a las 23 h de cultivo de la cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 y de la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL en presencia y ausencia de 3-MB

	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> KT2440 + 3-MB	<i>P. putida</i> KTHL	<i>P. putida</i> KTHL + 3-MB
DO₆₀₀ (23 h)	6.7	6.3	6.43	4.13
Contenido intracelular de PHA (g/l)	0.93	0.86	1.07	0.83
Biomasa (g/l)	1.457	1.268	1.5	0.914
Viabilidad (ufc/ml)	2.13E+07	2.09E+07	2.65E+07	2.11E+06

Para determinar el rendimiento del sistema lítico en *Pseudomonas putida* KTHL, una vez finalizada la fermentación en una fase, las células se sometieron a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa. En el tubo con la muestra de *Pseudomonas putida* KTHL inducida con 3-MB se observó una banda blanca en la interfase del gradiente, indicando la secreción del plástico al medio extracelular. En ausencia del inductor, los gránulos de PHA no se secretaron al medio y sedimentaron junto con la fracción celular. En el caso de la cepa salvaje, no se secretaron gránulos en ningún caso. Estos resultados demuestran que los gránulos de PHA solo se liberan al medio extracelular en la cepa recombinante con el sistema lítico integrado en el cromosoma (*Pseudomonas putida* KTHL) y en presencia del inductor de dicho sistema, demostrando la potencialidad de este sistema para los procesos de producción de PHA. Un inconveniente de este método de crecimiento y extracción de PHA es la incapacidad que presentan las células para sedimentar en el proceso de separación del plástico que ha sido secretado al medio, lo cual impide la cuantificación de la cantidad de PHA obtenido mediante GC-MS.

El crecimiento en dos fases fermentativas consiste en un nuevo sistema de fermentación/producción que permite una mejora en cuanto a la producción de PHA en *Pseudomonas putida* KTHL y en el funcionamiento del sistema de lisis. El procedimiento consiste en cultivar las células en un medio rico (medio LB) y a continuación traspasarlas a un medio específico de producción de PHA, donde se lisan tras la activación del sistema lítico.

Bajo las condiciones de fermentación anteriormente descritas, *Pseudomonas putida* KTHL es capaz de crecer y acumular PHA de manera similar a la cepa salvaje en cuanto a los niveles de DO₆₀₀ alcanzados por ambas cepas (Tabla 2). Este resultado fue confirmado mediante la cuantificación por GC-MS del contenido intracelular de PHA en las dos cepas, en presencia y ausencia del inductor (Tabla 2). Este resultado demostró nuevamente que la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL acumula una cantidad de PHA similar a la producida por la cepa salvaje.

Al igual que ocurre en las fermentaciones de una sola fase, cuando el inductor del sistema lítico está presente en el medio de cultivo se observa una inhibición en el crecimiento de *Pseudomonas putida* KTHL, que no se observa en la cepa salvaje bajo las mismas condiciones. Estos resultados también se confirmaron mediante la estimación de la viabilidad celular (ufc/ml) y la biomasa (g/l) de los cultivos (Tabla 2).

TABLA 2

Muestra el valor de densidad óptica ($\Delta_{600 \text{ nm}}$); el contenido intracelular de PHA; el recuento de células viables (ufc/ml) y la biomasa (g/l) correspondientes a células crecidas en dos fases fermentativas a las 23 h de cultivo de la cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 y de la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL en presencia y ausencia de 3-MB

	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> KT2440 + 3-MB	<i>P. putida</i> KTHL	<i>P. putida</i> KTHL + 3-MB
DO ₆₀₀ (23 h)	7.52	7.66	7.74	6.4
Contenido intracelular de PHA (g/l)	0.84	0.78	0.88	0.79
Biomasa (g/l)	2.38	2.26	2.45	2.28
Viabilidad (ufc/ml)	2.33E+09	3.16E+09	3.33E+09	5.15E+08

Para determinar el rendimiento del sistema lítico en *Pseudomonas putida* KTHL, una vez finalizada la fermentación, las células se sometieron a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa (Fig. 2). En el tubo con la muestra de *Pseudomonas putida* KTHL inducida con 3-MB (tubo 4) se observó una banda blanca en la interfase del gradiente, indicando la secreción del plástico al medio extracelular. En ausencia del inductor (tubo 3), los gránulos de PHA no se secretaron al medio y sedimentaron junto con la fracción celular. En el caso de la cepa salvaje, no se secretaron gránulos en ningún caso (tubos 1 y 2). Estos resultados demuestran que los gránulos de PHA sólo se liberan al medio extracelular en la cepa recombinante con el sistema lítico integrado en el cromosoma (*Pseudomonas putida* KTHL) y en presencia del inductor de dicho sistema, demostrando la potencialidad de este sistema para los procesos de producción de PHA.

Este mismo experimento se repitió de manera similar incluyendo una rotura total de la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL empleando la prensa de French (Aminco Corp.) a una presión de 20.000 psi., para comparar el porcentaje de lisis obtenido mediante el sistema lítico con el porcentaje de lisis obtenido empleando la prensa de French.

Para llevar a cabo la cuantificación del sistema lítico desarrollado en esta patente se comparó el contenido en PHA presente en los sedimentos celulares resultantes de la ultracentrifugación tras inducir lisis celular. Este experimento permite la cuantificación indirecta del gránulo secretado al medio extracelular debida al sistema lítico o a la prensa de French.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el porcentaje de rotura obtenido tras la inducción del sistema lítico en la cepa recombinante es menor al 10% del obtenido con la prensa de French, donde la ruptura celular es prácticamente total. Con el objetivo de mejorar este rendimiento del sistema de lisis, se estudió la sensibilidad de las cepas a distintos agentes químicos.

1.4. Sensibilidad de *Pseudomonas putida* KTHL frente a agentes químicos

Los grados de sensibilidad de la cepa *Pseudomonas putida* KTHL frente a los agentes químicos dodecilsulfato sódico (SDS), desoxicolato (DOC) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron analizados con el objetivo de mejorar el rendimiento del proceso de extracción del bioplástico. Las células se incubaron durante 18 h a 30°C en medio LB y en medio LB suplido con EDTA 0,2 mM, DOC 0,1%-0,05% (p/v) ó SDS 0,01% (p/v). A estas concentraciones, la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL inducida con 3-MB presentó una sensibilidad frente a los agentes químicos, mientras que en esta misma cepa sin inductor y la cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 (sin y con inductor) no se observó ningún efecto en el crecimiento. Estos resultados indican una alteración significativa en la permeabilidad de la membrana externa de *Pseudomonas putida* KTHL, debida a la expresión de la holina y la enzima lítica. De la misma manera, se determinaron las concentraciones mínimas de EDTA, DOC y SDS que no alteran el crecimiento de *Pseudomonas putida* KTHL inducida con 3-MB, siendo éstas las siguientes: EDTA 0,05-01 mM, DOC 0,01% (p/v) y SDS 0.005% (p/v). También se determinaron las concentraciones de EDTA y DOC que alteran el, crecimiento de las cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440, siendo éstas las siguientes: EDTA 0,4 mM y DOC 0,1-0,2% (p/v).

Con el objetivo de mejorar el rendimiento del proceso de extracción del PHA, se analizaron los grados de sensibilidad de la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL frente a EDTA, DOC y SDS en medio de producción de plástico. Una vez finalizada la fermentación en dos fases, las células se incubaron durante 7 h a temperatura ambiente con EDTA 10 mM y SDS 0,1% simultáneamente. A estas concentraciones, la cepa recombinante *Pseudomonas putida*

ES 2 370 947 A1

KTHL inducida con 3-MB presentó una sensibilidad similar que en ausencia de inductor y que la cepa salvaje. El hecho de no lograr la lisis de ninguna de las cepas a pesar de la alta concentración de los agentes químicos empleados, sugiere que la presencia del gránulo de PHA en el interior celular confiere resistencia a la bacteria.

5 Ejemplo 2

Construcción de cepas de Pseudomonas putida mutantes en el sistema Tol-pal, portadoras del sistema lítico de la cepa KTHL, y extracción de compuestos (PHA) sintetizados por las mismas

10 2.1. Estudio de la expresión del sistema de autólisis celular en las cepas mutantes en el sistema Tol-pal, Pseudomonas putida AX, BX, QX y RX

Para mejorar la eficacia del sistema lítico en la producción de PHA, se testaron cepas mutantes en el complejo Tol-pal, que presentan la envoltura celular desestructurada.

15 En primer lugar se comprobó la capacidad de estas cepas mutantes (*Pseudomonas putida* AX, *Pseudomonas putida* BX, *Pseudomonas putida* QX y *Pseudomonas putida* RX) para crecer y acumular PHA de la misma manera que la cepa parental *Pseudomonas putida* KT2440. La cuantificación del contenido intracelular de PHA mediante GC-MS de las cepas anteriormente descritas crecidas en dos fases fermentativas es similar, e incluso mayor, que la de la cepa parental. Los valores de contenido intracelular de PHA obtenidos para *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas putida* KTHL, *Pseudomonas putida* AX, *Pseudomonas putida* BX, *Pseudomonas putida* QX y *Pseudomonas putida* RX fueron 0.71 g/l, 0.88 g/l, 1.0 g/l, 0.82 g/l, 1.03 g/l y 0.87 g/l, respectivamente.

25 2.2. Construcción de cepas de Pseudomonas putida KT2440 mutantes en el sistema tol-pal portadoras del sistema de autólisis (Pseudomonas putida AXHL, Pseudomonas putida BXHL, Pseudomonas putida QXHL y Pseudomonas putida RXHL)

Mediante conjugación triparental con la cepa CC118 λ pir (pCNBHL) (Tabla 4) se introdujo el casete *ejh-ejl* en el genoma de la cepa *Pseudomonas putida* AX, generando la cepa *Pseudomonas putida* AXHL, siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el ejemplo 1.1. De forma similar, se construyó el resto de mutantes en el sistema Tol-pal portadores del sistema lítico: *Pseudomonas putida* BXHL, *Pseudomonas putida* QXHL y *Pseudomonas putida* RXHL (Tabla 3).

35 A continuación, se comprobó la capacidad de estos mutantes en el sistema Tol-pal portadores del sistema lítico (*Pseudomonas putida* AXHL, *Pseudomonas putida* BXHL, *Pseudomonas putida* QXHL y *Pseudomonas putida* RXHL) para crecer en medio de producción de PHA en dos fases fermentativas. Se observó que *Pseudomonas putida* BXHL era la única cepa capaz de alcanzar una densidad óptica similar a la de la cepa *Pseudomonas putida* KTHL, mientras que los demás mutantes no crecieron de manera óptima.

40 Para corroborar estos resultados, se cuantificó el contenido intracelular de PHA de las cepas descritas crecidas en dos fases fermentativas, siendo éste menor a 0.2 g/l en las cepas *Pseudomonas putida* AXHL, *Pseudomonas putida* RXHL y *Pseudomonas putida* QXHL. Sin embargo, el contenido de PHA de *Pseudomonas putida* BXHL (0.88 g/l) es similar, e incluso mayor, al de la cepa *Pseudomonas putida* KTHL (0.78 g/l).

45 Teniendo en cuenta todos estos resultados, se seleccionó la cepa mutante en la proteína TolB portadora del sistema de autólisis, *Pseudomonas putida* BXHL.

2.3. Estudio de la expresión del sistema de autólisis celular en la cepa recombinante Pseudomonas putida BXHL

50 Una vez comprobada la capacidad de la cepa mutante en la proteína TolB del sistema Tol-pal portadora del sistema lítico en monocopia (*Pseudomonas putida* BXHL) para crecer y producir PHA en un medio mínimo limitado en nitrógeno y con ácido octanoico como única fuente de carbono, se determinaron otros parámetros de fermentación concluyéndose que, en estas condiciones, la tasa de crecimiento de la cepa mutante fue inferior al índice de crecimiento de la cepa parental *Pseudomonas putida* KT2440. *Pseudomonas putida* BXHL solo fue capaz de crecer y acumular PHA de la misma manera que la cepa parental cuando el crecimiento se llevó a cabo en dos fases fermentativas.

La cuantificación del contenido intracelular de PHA de la cepa *Pseudomonas putida* BXHL en presencia y ausencia de 3-MB crecida en dos fases fermentativas en comparación con la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL, mostró que la producción de polímero es similar en ambas cepas. Los valores de contenido intracelular de PHA obtenidos para *Pseudomonas putida* KTHL en presencia y ausencia de 3-MB fueron 0.68 y 0.77 g/l, respectivamente. Los valores obtenidos para *Pseudomonas putida* BXHL en presencia y ausencia de 3-MB fueron 0.72 y 0.79 g/l, respectivamente.

65 La estimación de la viabilidad celular confirmó que, al igual que ocurría en las fermentaciones de *Pseudomonas putida* KTHL, cuando el inductor del sistema lítico (3-MB) está presente en el medio de cultivo se observa una inhibición en el crecimiento de *Pseudomonas putida* BXHL, que no se observa en la cepa salvaje bajo las mismas condiciones (Fig. 3). Además, con esta cepa la ruptura celular observada es significativamente mayor que la obtenida con la cepa *Pseudomonas putida* KTHL.

ES 2 370 947 A1

Para llevar a cabo la cuantificación indirecta de la ruptura celular obtenida mediante el sistema lítico en *Pseudomonas putida* BXHL, se comparó el contenido en PHA presente en los sedimentos celulares resultantes de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa tras inducir la lisis celular. La cuantificación del PHA presente en los sedimentos resultantes de la ultracentrifugación permite concluir que el porcentaje de ruptura obtenido tras la inducción del sistema lítico en la cepa *Pseudomonas putida* BXHL es significativamente menor que el obtenido con la prensa de French, donde la ruptura celular era prácticamente total (resultados no mostrados).

Con el objetivo de mejorar este rendimiento del sistema de lisis en la cepa *Pseudomonas putida* BXHL, una vez crecidas las células se incubaron con EDTA 10 mM y SDS 0,1%, y se sometieron a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa (Fig. 4). La muestra de *Pseudomonas putida* BXHL inducida con 3-MB (tubo 2) presenta una banda blanca de PHA en la interfase del gradiente significativamente mayor que la banda de la cepa parental *Pseudomonas putida* KT2440 bajo las mismas condiciones (tubo 1). La centrifugación en gradiente indica una lisis prácticamente total del cultivo, similar a la obtenida mediante la prensa de French.

Para corroborar estos resultados, se cuantificó el contenido intracelular de PHA de la cepa BXHL cultivada en presencia de 3-MB siendo del orden de 1,05 g/l. Cuando esta cepa se incubaba con 3-MB, EDTA y SDS, no se detecta PHA en la fracción intracelular (Fig. 5).

3. Materiales y métodos

3.1. Descripción de los microorganismos, plásmidos y cebadores empleados

Las cepas de *Pseudomonas putida* y de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 3.

TABLA 3
Cepas empleadas

Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i> CC118 λ pir	$\Delta(ara-leu)$ <i>araD</i> , $\Delta lacX74$, <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> Rf ^r , Sp ^r , contiene el fago λ pir	Herrero <i>et al.</i> , 1990. <i>J. Bacteriol.</i> , 172: 6557-6567
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2 curada del plásmido TOL, <i>hsdR</i>	Nakazawa <i>et al.</i> , 2002. <i>Environ Microbiol.</i> 4: 782-786.
<i>Pseudomonas putida</i> KTHL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> , Km ^r	Este trabajo
<i>Pseudomonas putida</i> AX	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolA::xylE</i> (con TolA acortado a 94 aminoácidos)	Llamas <i>et al.</i> 2000 <i>J. Bacteriol.</i> , 182: 4764–4772 (Llamas <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas putida</i> BX	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolB::xylE</i> (con TolB acortado a 29 aminoácidos)	Llamas <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas putida</i> QX	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolQ::xylE</i> (con TolQ acortado a 17 aminoácidos)	Llamas <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas putida</i> RX	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolR::xylE</i> (con TolR deletado)	Llamas <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas putida</i> AXHL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolA::xylE</i> portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> ,	Este trabajo

ES 2 370 947 A1

	Km ^r		
5	<i>Pseudomonas putida</i> BXHL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolB::xylE</i> portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> , Km ^r	Este trabajo
10	<i>Pseudomonas putida</i> QXHL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolQ::xylE</i> portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> , Km ^r	Este trabajo
15	<i>Pseudomonas putida</i> RXHL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolR::xylE</i> portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> , Km ^r	Este trabajo
20			

TABLA 4
Plásmidos utilizados

Plásmido	Características relevantes	Referencia
30	pNM185	Mermod <i>et al.</i> , 1986. <i>J. Bacteriol.</i> 167: 447-454
35	pEDF12	Díaz <i>et al.</i> , 1994. <i>Mol. Microbiol.</i> 13: 855-861
40	pCNB1	De Lorenzo <i>et al.</i> , 1993. <i>Gene.</i> 130: 41-46
45	pUC18Not	Herrero <i>et al.</i> , 1990. <i>J. Bacteriol.</i> 172: 6557-6567
50	pCNBHL	Este trabajo
55		
60		

ES 2 370 947 A1

TABLA 5

Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de productos por PCR. Las secuencias subrayadas se corresponden con las dianas de restricción creadas

Nombre	Secuencia(5' → 3')
V 08	SEQ ID NO: 3; CTAGTCTAGAGGCCAACAACATTACCATAATAGAA
V 09	SEQ ID NO: 4; CGCGGATCCGTCTTTCTATTTTGTGCGTAATCAAGCCG

3.2. Medios y condiciones de cultivo empleados

El medio rico utilizado para cultivar las células de *E. coli* y *Pseudomonas putida* fue el Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Rusell, 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). El medio mínimo utilizado para cultivar las células fue el medio denominado 0.1 N M63 (13,6 g KH₂PO₄; 0,2 g (NH₄)₂SO₄; 0,5 mg SO₄Fe × 7 H₂O por litro, pH 7) suplementado con 1 mM de MgSO₄ y una solución de elementos traza (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212). Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces en un agitador orbital (New brunswick scientific) a 200 rpm. Las células de *E. coli* y *Pseudomonas putida* se incubaron a 37°C y 30°C, respectivamente.

El crecimiento en medio líquido se determinó por turbidimetría a 600 nm (DO₆₀₀) empleando un espectrofotómetro Beckman DU-520.

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4°C en placas de LB o medio mínimo. Para la conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

Para producir PHA se cultivaron las células de *Pseudomonas putida* KT2440 durante 24 h en medio M63 0,1 N cuya composición es similar a la del M63 pero con 0,2 g/l de (NH₄)₂SO₄ en lugar de 2 g/l, utilizando 15 mM de octanoato como única fuente de carbono (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212).

3.3. Transformación genética de las células utilizadas

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de RbCl (Sambrook y Rusell, 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.), o bien mediante electroporación (Wirth *et al.*, 1989 *Mol Gen Genet* 216: 175-177).

Las células de *Pseudomonas putida* se modificaron genéticamente por transformación por electroporación. Para electroporar las células de *Pseudomonas putida* se recogieron células en cultivo líquido o masa celular proveniente de placas de agar y se realizaron cinco lavados con agua estéril a 4°C. Las condiciones del equipo de electroporación *Gene Pulser/Pulse Controller* (Bio-Rad) fueron 2,5 kV, 25 μF y 200 Ω.

En algunas circunstancias los plásmidos se movilaron a *Pseudomonas putida* por conjugación bi- o tri-parental siguiendo el método descrito por de Lorenzo y Timmis, (1994) *Methods Enzymol* 235: 386-405) y utilizando la cepa *E. coli* HB101 (pRK600) como cepa auxiliar. Los transconjugantes de *Pseudomonas putida* fueron seleccionados en placas de medio LB con los correspondientes antibióticos o en placas de medio mínimo con citrato al 0,2% y el correspondiente antibiótico.

3.4. Técnicas de manipulación de DNA utilizadas

Las técnicas utilizadas para la preparación y manipulación del DNA han sido descritas por Sambrook y Rusell (2001). Las enzimas de restricción se obtuvieron de Amersham, Takara y *New England Biolabs*. La enzima T4 DNA ligasa fue proporcionada por USB (Amersham), la DNA polimerasa I de *Thermus sp.* y la Pfu polimerasa fueron suministradas por Biotools B&M Labs. S. A. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron empleando geles de agarosa, mediante el kit *GeneClean* (BIO 101) o el *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo empleando el sistema *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo empleando el *GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation*

ES 2 370 947 A1

Kit (GE Healthcare) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La amplificación del DNA se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* de Eppendorf. Las mezclas de reacción contenían MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, dimetilsulfóxido al 10%, 0,5 unidades de DNA polimerasa, 100 ng de DNA molde y oligonucleótidos a una concentración final de 0,5 μM. Los fragmentos de DNA se purificaron empleando geles de agarosa, usando el kit *GeneClean* (BIO 101) o el kit “*High Pure*TM PCR Product Purification Kit” (Boehringer Mannheim).

Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR fueron adquiridos en Sigma-Genosys y se indican en la Tabla 5.

3.5. Cuantificación de PHA

Para cuantificar el PHA presente en los sedimentos celulares se tomaron de 5 a 10 mg de muestra liofilizada que se metanolizaron durante 4 h a 100°C en presencia de 2 ml de cloroformo y 2 ml de metanol:ácido sulfúrico (85:15, v:v) con 0,5 mg/ml de ácido metil benzoico como estándar interno. Tras enfriar los tubos, se añadió 1 ml de agua, se mezcló por agitación vigorosa (vórtex) y se separaron las fases centrifugando suavemente. La fase orgánica obtenida se analizó en un sistema cromatográfico compuesto por un cromatógrafo de gases Agilent (Waldbronn, Alemania) serie 7890 A acoplado a un detector de masas 5975.

1 μl de la fase orgánica fue inyectada en el cromatógrafo con un *split* 50:1. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar HP5 MS (5% fenil-95% metil siloxano, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 mm). Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 0,9 ml/min. Las temperaturas del inyector y la línea de transferencia fueron de 275 y 300°C, respectivamente. El programa de temperatura de la columna fue el siguiente: temperatura inicial 80°C durante 2 min tras lo cual se aplicó una rampa de 10°C/min hasta alcanzar los 200°C. El espectro de masas se recogió en modo *full scan* (m/z 40-550). El análisis cuantitativo se llevó a cabo calculando los factores de respuesta de los monómeros con respecto al 3-MB. Para el cálculo de los factores se utilizaron mezclas de concentraciones conocidas de PHA, obteniéndose para cada uno de los monómeros cuantificados un factor de respuesta cuyo coeficiente de variación no superó el 5%.

3.6. Determinación de la sensibilidad de las bacterias a aceleradores de lisis

Para determinar la sensibilidad de las bacterias a dodecilsulfato sódico (SDS), desoxicolato (DOC) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se inocularon las cepas en medio LB a DO600 0,5. Tras 6 h de incubación en agitación orbital se añadieron distintas concentraciones de los agentes químicos anteriormente mencionados durante 18 h. El crecimiento de estos cultivos se llevó a cabo en placas de 96 pocillos a 30°C con 2 min de agitación orbital fuerte cada 15 min (Multiskan Ascent, Thermo). Los valores de crecimiento que se muestran son la media de 3 replicados.

REIVINDICACIONES

5 1. Cepa recombinante bacteriana *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende las secuencias nucleotídicas que codifican:

- a) una enzima lítica de pared celular,
- b) una holina, y
- 10 c) un sistema regulador de la expresión génica.

15 2. Cepa según la reivindicación 1, donde:

- a) la enzima lítica de pared celular es la endolisina Ejl,
- b) la holina es la proteína Ejh, y
- 20 c) el sistema regulador de la expresión génica es XylS/Pm.

25 3. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7659.

4. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 es mutante en uno o más de los genes *tol-pal*.

5. Cepa según la reivindicación 4, donde dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7658.

30 6. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el sistema genético heterólogo lítico está insertado en su ADN cromosómico.

35 7. Cepa según la reivindicación 6, donde el sistema genético heterólogo lítico insertado en su ADN cromosómico se encuentra en una sola copia.

8. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la extracción de polihidroxialcanoato (PHA).

40 9. Método para la extracción de polihidroxialcanoato (PHA) sintetizado por la bacteria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:

- a) cultivar dicha cepa en un medio mínimo de cultivo,
- b) añadir un compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico al cultivo del paso (a),
y
- 45 c) aislar el compuesto sintetizado por dicha bacteria.

50 10. Método según la reivindicación 9, donde además comprende un paso previo al paso (a) donde la cepa o población bacteriana se cultiva en un medio rico de cultivo.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, donde el compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico es ácido 3-metilbenzoico.

55 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde además, tras el paso (b), se adiciona una sustancia química que produce lisis celular o que acelera la lisis celular mediada por el sistema genético heterólogo lítico.

60 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde además, después del paso (a), se adiciona un precursor de PHA.

14. Método según la reivindicación 13, donde el precursor de PHA es un ácido graso o cualquier molécula susceptible de ser transformada en hidroxialcanoil-CoA mediante el metabolismo bacteriano.

65

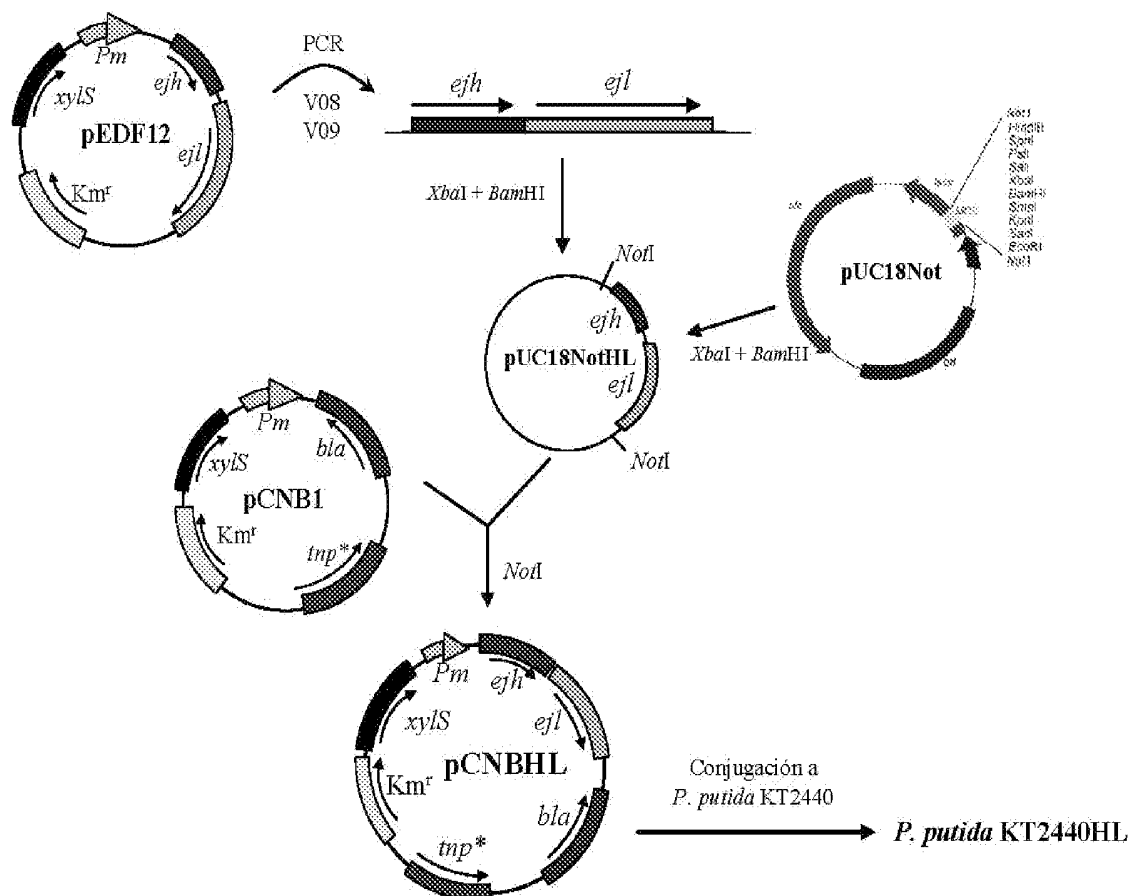


FIG 1

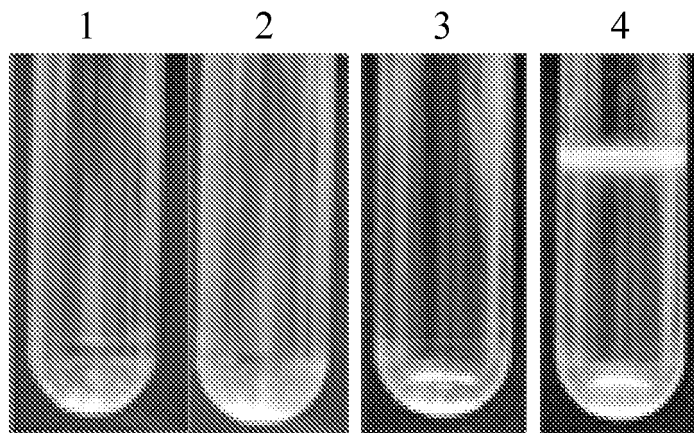


FIG. 2

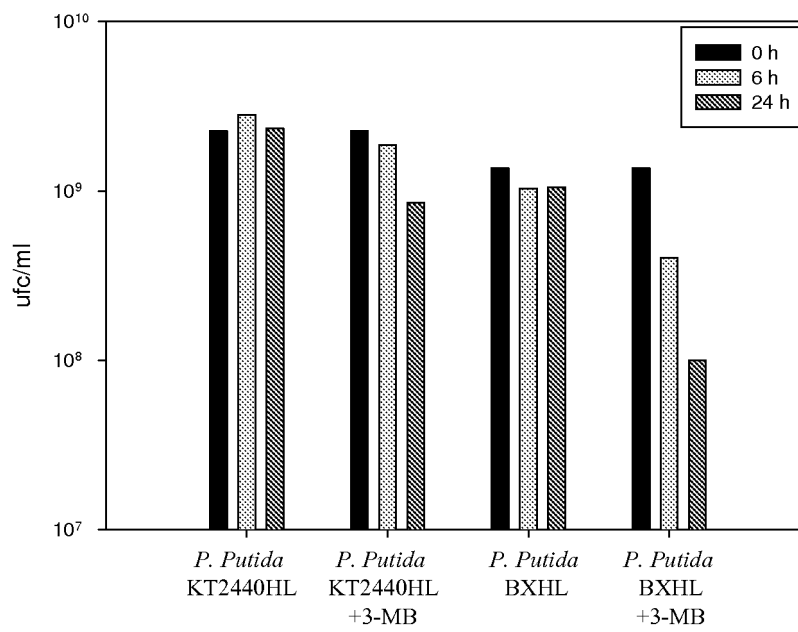


FIG. 3

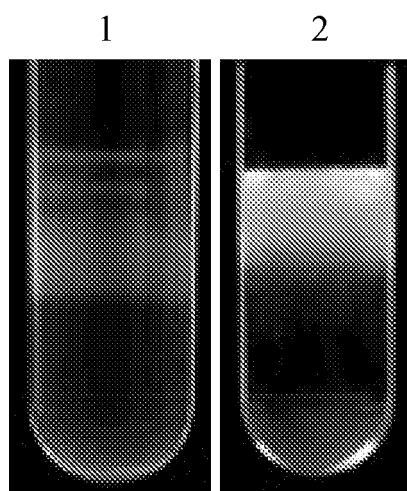


FIG. 4

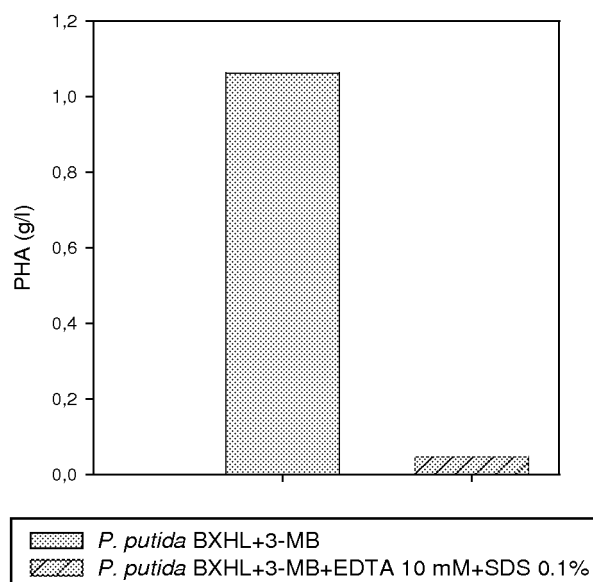


FIG. 5

ES 2 370 947 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

5 <120> Sistema de autólisis celular para el procesado de la biomasa bacteriana en la producción de polihidroxicarbohidratos en *Pseudomonas putida* KT2440

<130> 1641.379

10

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 258

<212> DNA

20 <213> bacteriófago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*

<400> 1

25

atgattaact ggaaattacg actaaaaaat aaattctttt ggctgactgc cattccagcc 60

ttcttgcttg tcttgcaagc tggcgcagca gtctttggat atcatctgga cttaggtgat 120

30

atcggcaaca agctaattct gcttgcaat gcggtattcg tattcttgac tgctatcggc 180

ttggcgaatg acccgactac aagcgggaatc gcagacagca cagcagcgc tgaatacaag 240

aaaccaagtg aggagtaa 258

35

<210> 2

40

<211> 951

<212> DNA

<213> bacteriófago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*

45

50

55

60

65

ES 2 370 947 A1

<400> 2

5	atggatatcg atacaagcag actacgcacg gacttgccctc aagtaggagt gcaaccttat	60
	agacaagtac acgctcactc aactggaaac cgtaactcaa ctgctcaaaa cgaggcggat	120
	tatcactgga gaaaggaccc tgaacttggg ttcttttctc atgtggtcgg aaatggccga	180
10	gttatgcagg taggccctgt aaacaacggg agttgggacg ttgggggfcgg ttggaatgct	240
	gagacctatg cagcagttga attgattgaa agccattcaa ctgaagaaga gttcatggaa	300
15	gactaccgcc tctatatcga attgctacgt aatctagcag atgaagcaga cctaccaaaa	360
	actcttgata ctgacgactt ggcaggtatc aaaacacatg aatactgtac caataaccag	420
	cctaacaaca actcagacca cgttgaccct tatccatatac ttgccaaatg gggcgtttagc	480
20	cgatgaacagt tcaagcagga tattgaaaac ggcttgacaa ttgaagcagg ctggaagaaa	540
	aacgatacag gcacctggta cgtgtactca gacggctctt atccaaaaga taagtttgaa	600
25	aaggatcaacg gaacctggta ttacttcgac gggatcaggct atatgcttgc agaccgctgg	660
	aagaagcact cagacggcaa ttggatctgg tttgatcaat caggcgaat ggccacaggc	720
	tggaagaaaa tcgctgagaa gtggatctat ttcgacgtag aggggtgctat gaagacagga	780
30	tgggtcaagt ataaagacac ttggatctac ctgacagca aagacggtaa catggtatca	840
	aatgaattca tcagagcagg tcaaggctgg tactacatta aaccagacgg aacaatggct	900
35	gataagctag agttcacggt agaaccagac ggcttgatta cgacaaaata g	951

<210> 3

<211> 35

40 <212> DNA

<213> bacteriófago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*

45 <400> 3

ctagtctaga ggccaacaac attaccataa tagaa	35
--	----

50 <210> 4

<211> 37

<212> DNA

55 <213> bacteriófago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*

<400> 4

60 cgcgatccg tctttctatt ttgtcgtaat caagccg	37
--	----

<210> 5

<211> 966

65 <212> DNA

<213> *Pseudomonas putida*

ES 2 370 947 A1

<400> 5

	atggattttt gcttattgaa cgagaaaagt cagatcttcg tccacgccga gccctatgca	60
5	gtctccgatt atgttaacca gtatgtcggg acgcactcta ttcgcctgcc caagggcggg	120
	cgccccgcag gcaggctgca ccacagaatc ttcggatgcc tcgacctgtg tcgaatcagc	180
	tacggcggta gcgtgagggt aatctcgcct ggattagaga cctggtatca tctgcaaata	240
10	atactcaaag gccattgcct gtggcgtggc catggccagg agcactatct tgcgccgggc	300
	gaactattgc tgctcaatcc ggatgaccaa gccgacctga cctattcaga agattgcgag	360
15	aaatttatcg ttaaattgcc ctcaagtggc cttgatcggg catgcagtga caacaattgg	420
	cacaagccga gggaggggat ccgtttcgcc gcgcgacaca atctccagca actcgatggc	480
	tttatcaatc tactcggggt agtttgtgac gaagcgggaa atacaaagtc gatgcctcgg	540
20	gtccaagagc actatgcggg gatcatcgct tccaagctgc tcgaaatgct gggcagcaat	600
	gtcagccgtg aaattttcag caaaggtaac ccgtctttcg agcgagtcgt tcaattcatt	660
25	gaggagaatc tcaaacggaa tatcagcctt gagcgggttag cggagctggc gatgatgagt	720
	ccacgctcgc tctacaatct gttcgagaag catgccggca ccacgccgaa gaactacatc	780
	cgcaaccgca agctcgaaag catccgcgcc tgcttgaacg atcccagtcg caatgtgcgt	840
30	agtataactg agatagccct agactacggc ttcttacatt tgggacgctt cgctgaaaac	900
	tataggagcg cgttcggcga gttgccttcc gacaccctgc gtcaatgcaa aaaggaagtg	960
35	gcttga	966

<210> 6

<211> 746

<212> DNA

40 <213> *Pseudomonas putida*

<400> 6

	taacgacgct ggtcgtcctc gtgcggctgc tgggtgctgtg ctgaccctgc cgctgtcctg	60
45	atcggcctcg tcggcctcgt ggacggcctg tcgccggaca tcgcgcttcg gcgcgggacg	120
	cgagtcgggg ttcatctatc accgcgccag ggccagcctg atcccgctgg ccgtactgcc	180
50	gtgggtgact tacctggcac tgccggctcag cgtgaacccg ctgctgatcc tgctgcccag	240
	cgccgcactg ctcggcgtgg cgggtgtgcat cgctgcggcg acgttcaaga agtatctgta	300
	ggtgcgacac gttaattttg atcagcagtt ccttaacggc tgcagtgtcc ggtttgatag	360
55	ggataagtcc agccttgcaa gaagcggata caggagtgc aaaaatggct atctctagaa	420
	aggcctaccc cttaggcttt atgcaacaga aacaataata atggagtcat gaccatgaca	480
60	atgcacctgg ggctcgacta tatagatagt ctcgttgaag aagatgagaa cgagggcatc	540
	taccgctgca agcgcgagat gttcaccgac cctcggctgt tcgatttaga gatgaaacac	600
	atctttgagg gcaactggat ttatctcgcc cacgagagcc agattcccga gaagaacgac	660
65	tattacacca cgcagatggg ccggcagccg atattcatca cacgcaacaa agatggtgag	720
	ctgaatgcct tcgtcaatgc ctgcag	746



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931258

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DIAZ, E. et al.: "The two-step lysis system of pneumococcal bacteriophage EJ-1 is functional in Gram-negative bacteria: triggering of the major pneumococcal autolysin in Escherichia coli". Molecular Biology, 1996, vol. 19(4), págs. 667-681, ISSN 0950-382X (print), doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.399929.x. Todo el documento	1,2,6,7,8-14
X	HORI, K. et al. "Construction of self-disruptive Bacillus megaterium in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production". Appl. Microbiol. Biotechnol. (2002), Vol. 59 (2-3), págs. 211-216, ISSN 0175-7598, doi: 10.1007/s00253-002-0986-8. Todo el documento	8-14
A	LLAMAS, M. et al.: "Mutations in each of the tol genes of Pseudomonas putida reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability". J. Bacteriology ,2000, Vol. 182(17), págs. 4764-4772, ISSN 0021-9193, doi: 10.1128/JB.182.17.4764-4772.2000. Todo el documento	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

14.11.2011

Examinador

M. Á. Martín-Falquina Garre

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931258

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ELBAHLOUL Y. et al. "Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by Pseudomonas putida GP01 and a simplified downstream process". Applied and Environmental Microbiology, 2009, Vol. 75(3), págs. 643-651, ISSN 0099-2240, doi:10.1128/AEM.01869-08	8-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.11.2011

Examinador
M. Á. Martín-Falquina Garre

Página
2/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/06 (2006.01)

C12P7/62 (2006.01)

C12N15/78 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EPO-internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3-14	SI
	Reivindicaciones 1, 2	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 3-5	SI
	Reivindicaciones 6-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DIAZ, E. et al.: "The two-step lysis system of pneumococcal bacteriophage EJ-1 is functional in Gram-negative bacteria: triggering of the major pneumococcal autolysin in Escherichia coli". Molecular Biology, 1996, vol. 19(4), págs. 667-681, ISSN 0950-382X (print), doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.399929.x. Todo el documento	01.01.1996
D02	LLAMAS, M. et al.: "Mutations in each of the tol genes of Pseudomonas putida reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability". J. Bacteriology, 2000, Vol. 182(17), págs. 4764-4772, ISSN 0021-9193, doi: 10.1128/JB.182.17.4764-4772.2000. Todo el documento	00.09.2000
D03	HORI, K. et al. "Construction of self-disruptive Bacillus megaterium in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production". Appl. Microbiol. Biotechnol. (2002), Vol. 59 (2-3), págs. 211-216, ISSN 0175-7598, doi: 10.1007/s00253-002-0986-8	12.04.2002
D04	ELBAHLOUL Y. et al. "Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by Pseudomonas putida GPol and a simplified downstream process". Applied and Environmental Microbiology, 2009, Vol. 75(3), págs. 643-651, ISSN 0099-2240, doi:10.1128/AEM.01869-08	00.02.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**Reivindicación independiente 1**

El documento D1 (ver página 669, columna 2, párrafo 2 y figura 2), divulga una cepa recombinante bacteriana de Pseudomonas putida KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende las secuencias nucleotídicas que codifican:

- Una enzima lítica de pared celular que es la endolisina Ejl
- Una holina que es la proteína EJh y
- Un sistema regulador de la expresión génica que es XylS/Pm

En consecuencia, la reivindicación 1 no cumple el requisito de novedad.

Puesto que carece de novedad, tampoco cumple el requisito de actividad inventiva.

Reivindicaciones dependientes 2 a 7

El mismo razonamiento del apartado anterior aplica a la reivindicación 2.

Por lo que se refiere a las reivindicaciones 3-7, se considera que no se derivan directamente y sin ambigüedad de lo divulgado en el estado de la técnica disponible, por lo tanto cumplen el requisito de novedad.

El documento D2 se refiere al papel del sistema Tol-Opr (Tol-Pal) en el mantenimiento de la integridad de la membrana de P. putida. Divulga construcciones mutantes en uno o más de los genes tol-pal de dicho microorganismo (ver página 4764, columna 2 y figura 1); Sin embargo, en este documento no existe ninguna indicación que sugiera a un experto en la materia incluir esta mutación en una cepa como la descrita en D1 e incluso se mencionan las dificultades técnicas que supone la obtención de mutantes tol-pal de P. putida (ver página 4765, columna 1, párrafo 1). En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 3-5 cumplen el requisito de actividad inventiva.

Por el contrario, las reivindicaciones 6 y 7, en cuanto que dependen de la reivindicación 1, no cumplen el requisito de actividad inventiva ya que, partiendo de lo descrito en D1 (ver especialmente la página 678, columna 2, párrafo 2 y la figura 2), resulta obvio para un experto en la materia incorporar al cromosoma bacteriano en una sola copia las construcciones a que se refiere la invención.

Reivindicaciones independientes 8 y 9

El documento D3, considerado el estado de la técnica más próximo, divulga un sistema para obtener polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando una cepa bacteriana portadora de un sistema lítico integrado en el cromosoma bacteriano que provoca la lisis celular como respuesta a la falta de sustrato (ver resumen). El sistema lítico divulgado está integrado por los genes que codifican una holina y una endolisina bajo el control de un sistema inducible (ver figura 1).

La reivindicación 8 cumple el requisito de novedad, ya que la cepa bacteriana a que se refiere D3 es *Bacillus megaterium*. Sin embargo, dado que es conocido en el estado de la técnica utilizar *P. putida* para la obtención de PHA (ver D4), se considera que sustituir *Bacillus megaterium* por *P. putida* en un sistema para producir PHA como el descrito en D3 es obvio para un experto en la materia. En consecuencia, la reivindicación 8 carece de actividad inventiva.

Siguiendo el mismo razonamiento que para la reivindicación 8, la reivindicación 9 cumple el requisito de novedad, pero carece de actividad inventiva en vista del método para la extracción del PHA que enseña D3 (ver página 212, columna 2, párrafo 1).

Reivindicaciones dependientes 10-14

En tanto que dependientes de la reivindicación 9, las reivindicaciones 10-14 cumplen el requisito de novedad. Sin embargo, partiendo de lo divulgado en D3, carecen de actividad inventiva por las siguientes razones:

La reivindicación 10 es una mera opción que un experto en la materia consideraría dentro de lo que son las técnicas habituales de cultivo de poblaciones bacterianas; las reivindicaciones 11 y 12 son obvias en vista de D1 (ver página 671, columna 1 y figura 3) y por lo que se refiere a las reivindicaciones 13 y 14, resulta obvio para un experto en la materia aportar un precursor de PHA cuando se pretende obtenerlo por medios biológicos, como enseña D4 (ver resumen).