

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 946**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE REIVINDICACIONES DE SOLICITUD
DE PATENTE EUROPEA

T1

96 Número de solicitud europea: **10754372 .0**

96 Fecha de presentación de la solicitud: **30.07.2010**

97 Número de publicación de la solicitud: **2470637**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2012**

30

Prioridad:
31.07.2009 US 533649

71

Solicitante/s:
**CP Kelco US, Inc.
3100 Cumberland Boulevard Suite 600
Atlanta, GA 30339, US**

43

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.09.2012

72

Inventor/es:
**HARDING, Nancy E.;
PATEL, Yamini N.;
TALASHEK, Todd y
TUTAK, Jeff**

46

Fecha de publicación de la traducción de las
reivindicaciones: **07.09.2012**

74

Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

54

Título: **Cepas de Sphingomonas que producen un rendimiento muy aumentado por esfingano deficiente en PHB (Diutano)**

ES 2 386 946 T1

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante del género *Sphingomonas*, que contiene:

al menos una modificación genética que elimina sustancialmente o completamente la producción de polihidroxitirato (PHB);

5 al menos una modificación genética que da como resultado un aumento de la producción de un esfingano, que comprende una modificación genética que incrementa la expresión de al menos un gen implicado en la síntesis de esfingano, donde dicho al menos un gen implicado en la síntesis de esfingano se selecciona del grupo que consiste en los genes contenidos en el inserto en los plásmidos pS8 (SEQ ID NO: 1), pX6 (SEQ ID NO: 54), el plásmido contenido en la cepa ATCC PTA-10102, el plásmido contenido en la cepa ATCC PTA-10103, y
10 *Sphingomonas* homólogos del mismo;

15 por medio de las cuales la cepa mutante del género *Sphingomonas* puede producir un incremento en la producción de un esfingano que está esencialmente libre de PHB con respecto a una cepa congénica que contiene la al menos una modificación genética que elimina sustancialmente o completamente la producción de PHB y que carece de la al menos una modificación genética que da como resultado un incremento de la producción de un esfingano.

2. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 1, donde el esfingano se selecciona del grupo que consiste en diutano, S-7, gelano, S-88, welano, rhamsano, S-198, NW-11, y alcalano.

3. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 2, donde el esfingano es diutano.

20 4. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 1, donde dicho al menos un gen implicado en la síntesis de esfingano se selecciona del grupo que consiste en los genes *dpsS*, *dpsG*, *dpsR*, *dpsQ*, *dpsI*, *dpsK*, *dpsL*, *dpsJ*, *dpsF*, *dpsD*, *dpsC*, *dpsE*, *dpsM*, *dpsN*, *atrD*, *atrB*, *dpsB*, *rmlA*, *rmlC*, *rmlB*, *rmlD*, *orf7*, *orf6*, *orf5* de *Sphingomonas* sp. ATCC 53159, y *Sphingomonas* homólogos del mismo.

25 5. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 1, donde dicho *Sphingomonas* homólogo de al menos un gen implicado en la síntesis de esfingano deriva de una especie de *Sphingomonas* seleccionada del grupo que consiste en *Sphingomonas elodea* ATCC 31461, *Sphingomonas* sp. ATCC 31555, *Sphingomonas* sp. ATCC 31961, *Sphingomonas* sp. ATCC 53159, *Sphingomonas* sp. ATCC 31554, *Sphingomonas* sp. ATCC 31853, *Sphingomonas* sp. ATCC 21423, *Sphingomonas* sp. ATCC 53272, y *Sphingomonas* sp. FERM-BP2015.

30 6. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 1, donde la al menos una modificación genética que da como resultado un incremento de la producción de un esfingano se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una conexión operable de al menos un gen implicado en la síntesis de esfingano a un promotor ectópico;

(ii) un número incrementado de copias por cromosoma bacteriano de al menos un gen implicado en la síntesis de esfingano; y

(iii) cualquier combinación de los mismos,

35 donde cada uno de dichos al menos un gen implicados en la síntesis de esfingano están contenidos en un cromosoma bacteriano o un elemento extracromosómico.

40 7. la cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 1, donde la al menos una modificación genética que elimina sustancialmente o completamente la producción de PHB es una mutación que inactiva o suprime constitutivamente o condicionalmente un gen seleccionado del grupo que consiste en el gen *phaA*, el gen *phaB*, y el gen *phaC* o una combinación de los mismos.

8. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 1, donde la al menos una modificación genética que elimina sustancialmente o completamente la producción de PHB es una inserción o delección que inactiva el gen *phaC*.

45 9. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 3, donde la cepa mutante del género *Sphingomonas* es capaz de producir diutano a una velocidad de al menos alrededor de 0,15 g/L/hora o un rendimiento de diutano de al menos alrededor de 12 g/L.

10. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 3, donde la cepa mutante del género *Sphingomonas* es capaz de producir diutano a una velocidad de al menos alrededor de 0,2 g/L/hora o un rendimiento de diutano de al menos alrededor de 15 g/L.

50 11. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 3, donde la cepa mutante del género *Sphingomonas* aumenta la velocidad de producción o el rendimiento de diutano en al menos alrededor de 50% con

respecto a una cepa congénica que contiene la al menos una modificación genética que elimina sustancialmente o completamente la producción de PHB y que carece de la al menos una modificación genética que da como resultado un incremento de la producción de esfingano.

5 12. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 3, donde un diutano clarificado producido a partir de la cepa mutante del género *Sphingomonas* proporciona menos de 0,5% de residuo en un ensayo de solubilidad y residuo en HCl al 15%, o menos de 0,1% en peso de PHB cuando se mide utilizando cromatografía de gases.

10 13. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 3, donde el diutano clarificado producido a partir de la cepa mutante del género *Sphingomonas* y rehidratado como un litro de diutano al 0,4% en agua de mar puede pasar a través de un filtro Nuclepore en menos de cinco minutos a una presión de flujo de aproximadamente 20 psi;

donde el filtro Nuclepore tiene un diámetro de aproximadamente 47 mm y tiene un tamaño de poro de aproximadamente 3 micras.

15 14. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 3, donde el diutano producido a partir de la cepa mutante del género *Sphingomonas* está esencialmente libre de PHB, y donde el diutano muestra una viscosidad en agua de mar a 3 rpm de al menos alrededor de 40 de lectura del indicador, una viscosidad en agua de mar a 0,3 rpm de al menos alrededor de 37.000 cp, o una viscosidad a una velocidad de cizalladura baja en presencia de dispersante de polietilenglicol de al menos alrededor de 3.500 cp.

20 15. La cepa mutante del género *Sphingomonas* de la reivindicación 3 que es una cepa de *Sphingomonas* sp. ATCC 53159 seleccionada del grupo que consiste en las cepas PDD3 / pS8, PDD3 / pX6, PDD6 / pS8, y PDD6 / pX6.

25 16. Una composición que comprende diutano, donde la composición está esencialmente libre de polihidroxibutirato (PHB), y donde el diutano muestra una viscosidad en agua de mar a 3 rpm de al menos alrededor de 32 de lectura del indicador, una viscosidad en agua de mar a 0,3 rpm de al menos alrededor de 24.000 cp, o una viscosidad a una velocidad de cizalladura baja en presencia de dispersante de polietilenglicol de al menos alrededor de 3.000 cp.

30 17. La composición de la reivindicación 16, donde el diutano muestra una viscosidad en agua de mar a 3 rpm de al menos alrededor de 40 de lectura del indicador, una viscosidad en agua de mar a 0,3 rpm de al menos alrededor de 37.000 cp, o una viscosidad a una velocidad de cizalladura baja en presencia de dispersante de polietilenglicol de al menos alrededor de 3.500 cp.

18. La composición de la reivindicación 16, donde el diutano muestra una viscosidad en agua de mar a 3 rpm de al menos alrededor de 45 de lectura del indicador, una viscosidad en agua de mar a 0,3 rpm de al menos alrededor de 40.000 cp, o una viscosidad a una velocidad de cizalladura baja en presencia de dispersante de polietilenglicol de al menos alrededor de 5.500 cp.

35 19. Un método de elaboración de esfingano que está esencialmente libre de polihidroxibutirato (PHB), que comprende:

hacer crecer una cepa mutante del género *Sphingomonas* en condiciones que facilitan la producción de esfingano; y

opcionalmente, aislar el esfingano del cultivo resultante,

40 donde dicha cepa mutante del género *Sphingomonas* contiene:

al menos una modificación genética que da como resultando un incremento de la producción de un esfingano; y

al menos una modificación genética que elimina sustancialmente o completamente la producción de PHB.

45 20. El método de la reivindicación 19, donde el esfingano es diutano.

FIG. 1. Los plásmidos pX6 y pS8 incrementan enormemente la productividad de diutano (g/L/hora) en cepas carentes de PHB (PDD3 y PDD6).

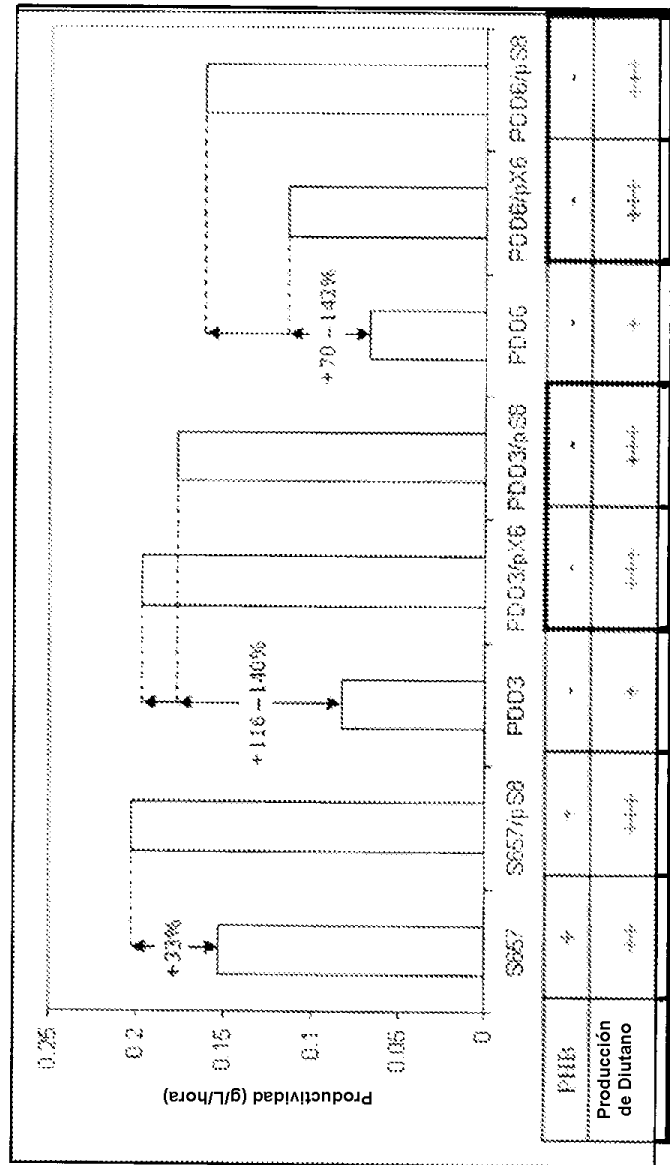


FIG. 2 Los plásmidos pX6 y pS8 incrementan enormemente el rendimiento de diutano (g/L) de cepas carentes de PHB (PDD3 y PDD6)

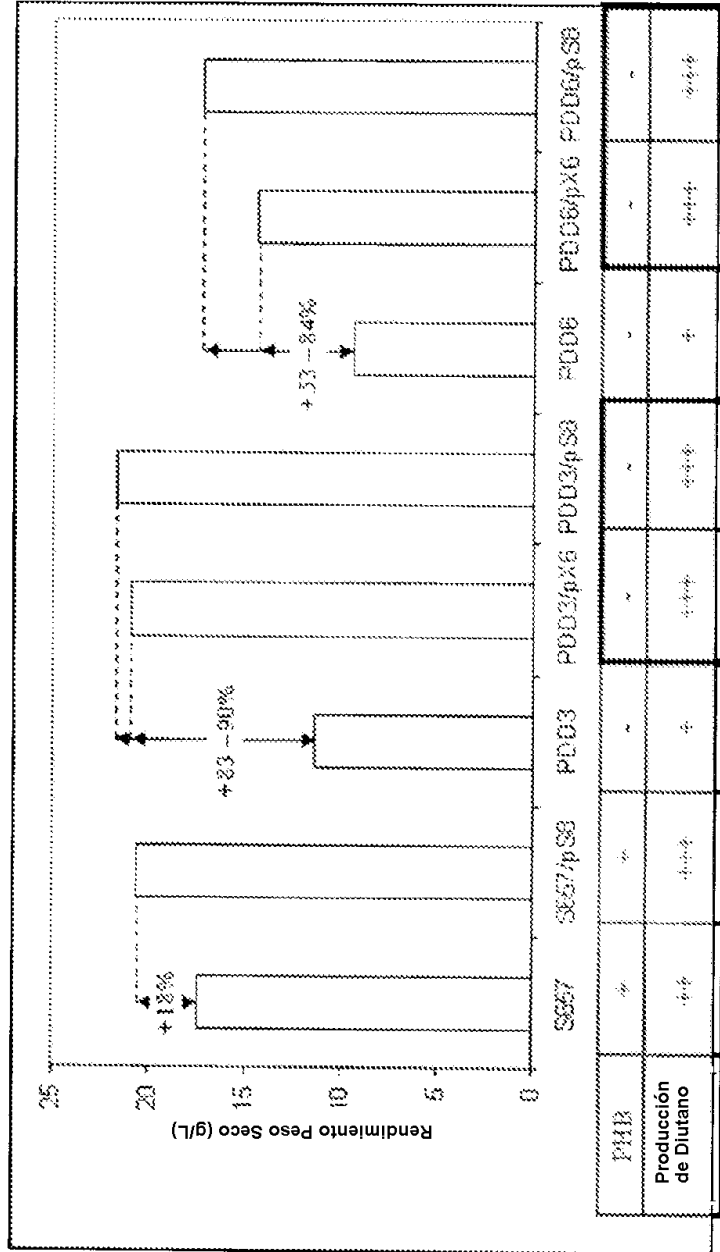
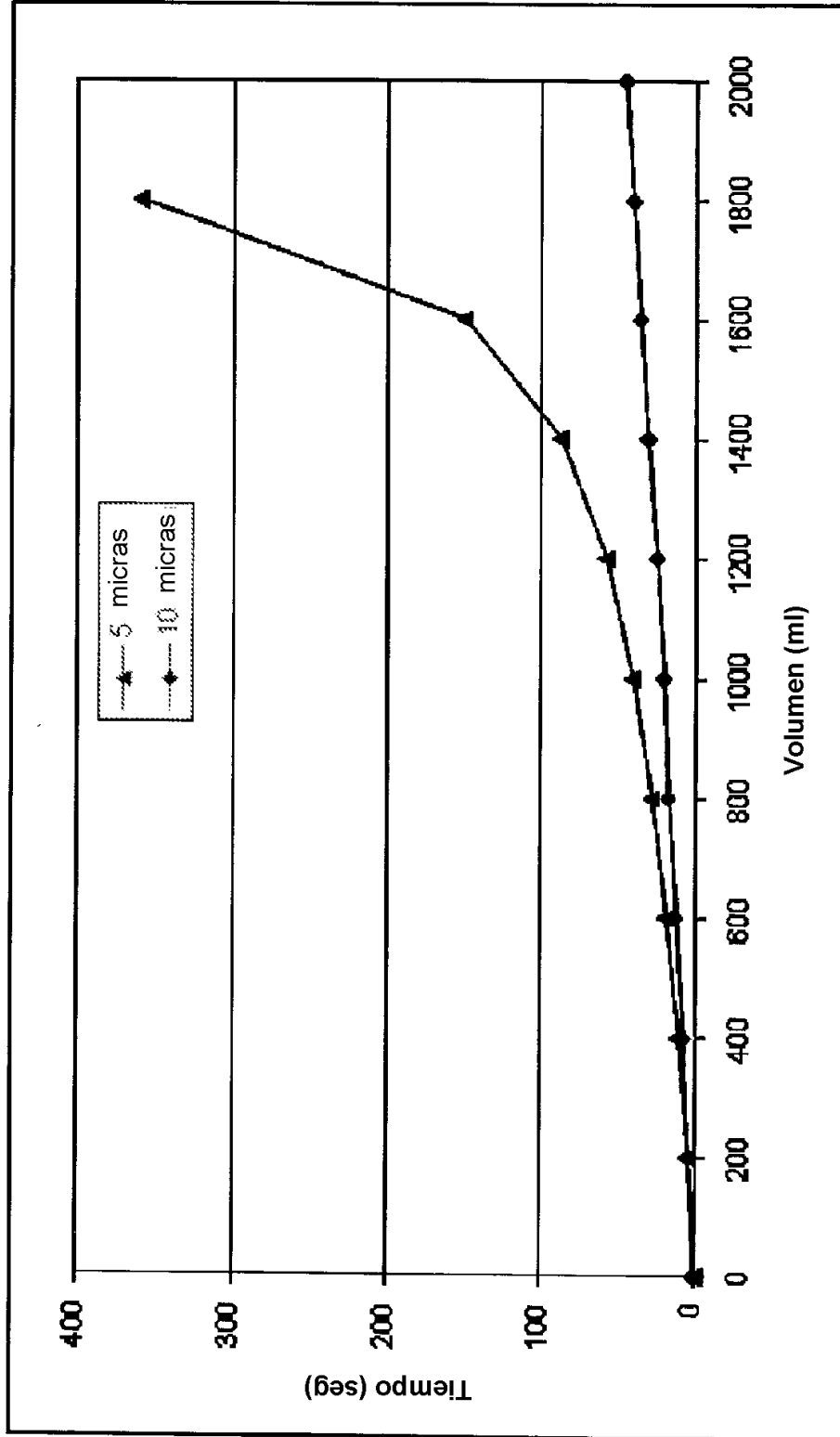


FIG. 3A. Escasa filtrabilidad de una preparación de diutano de diutano que contiene PHB (diutano de S657/pS8 en agua de mar al 0,04%)



**FIG. 3B. Escasa filtrabilidad de una preparación de diutano que contiene PHB
(diutano de S657/pS8 en agua de mar al 0,04%)**

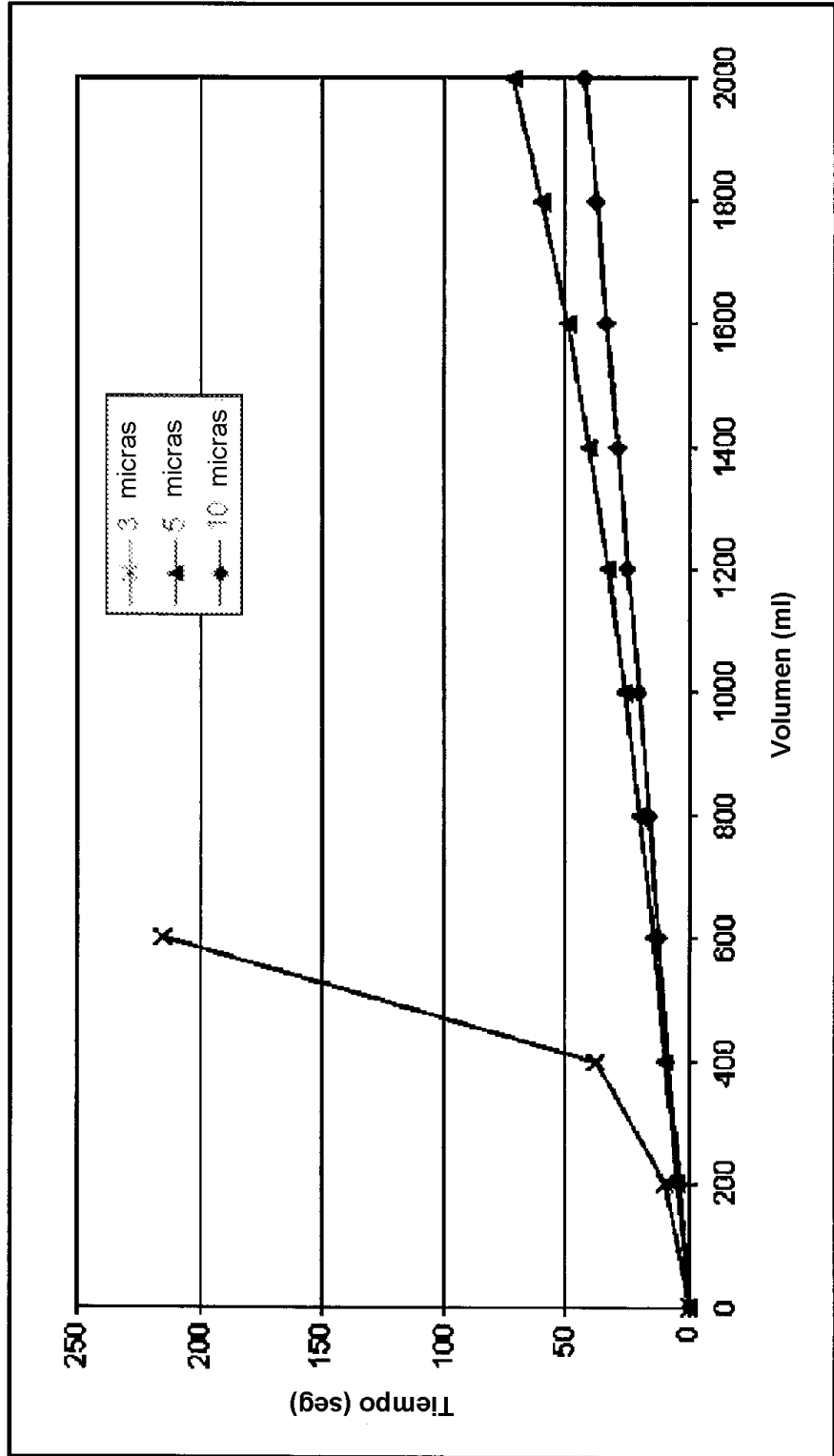


FIG. 4A. Filtrabilidad mejorada de una preparación de diutano carente de PHB
(diutano de PDD3/pS8 en agua de mar al 0,04%)

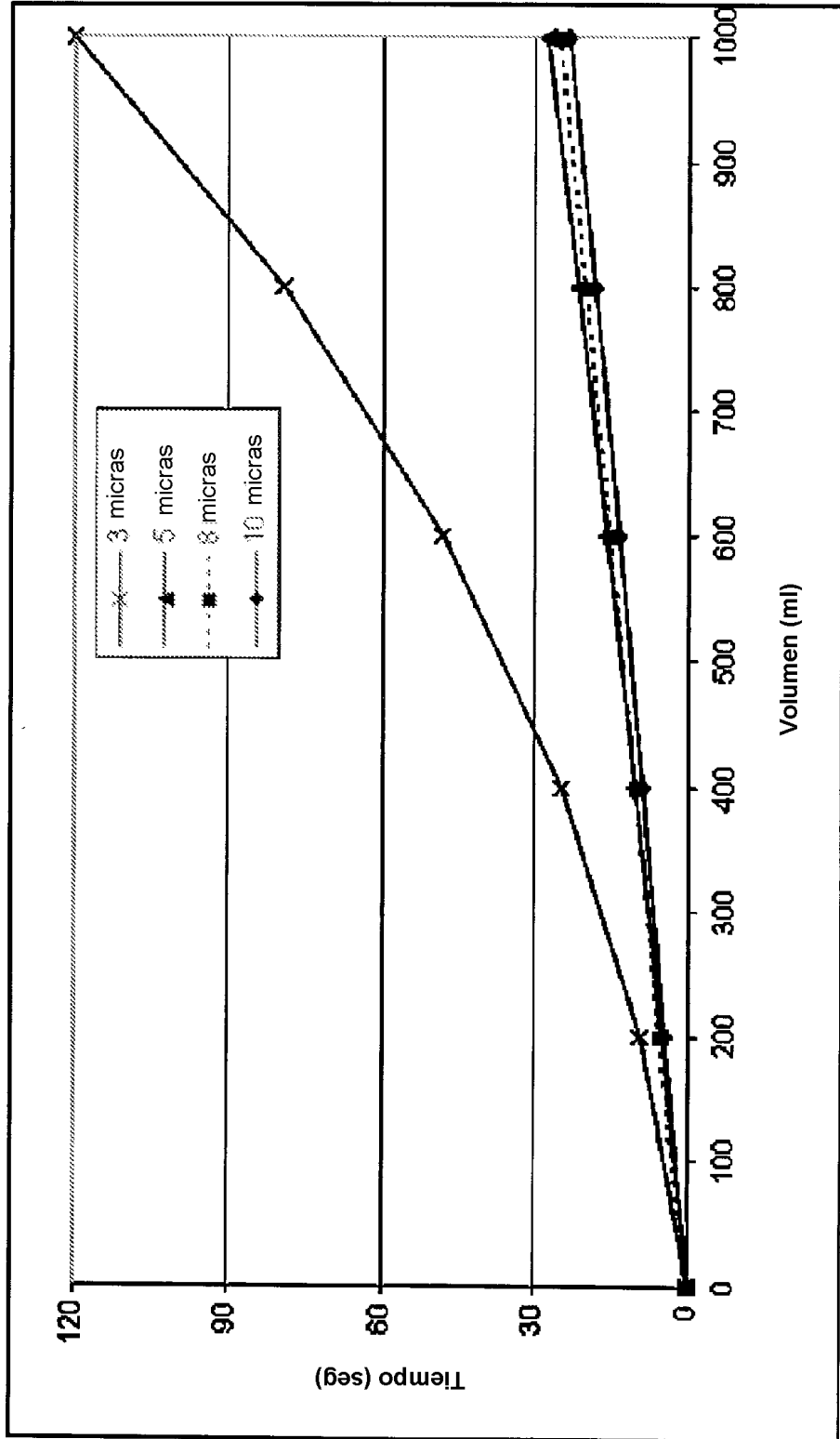


FIG. 4B. Filtrabilidad mejorada de una preparación de diutano carente de PHB
(diutano de PDD3/pS8 en agua de mar al 0,04%)

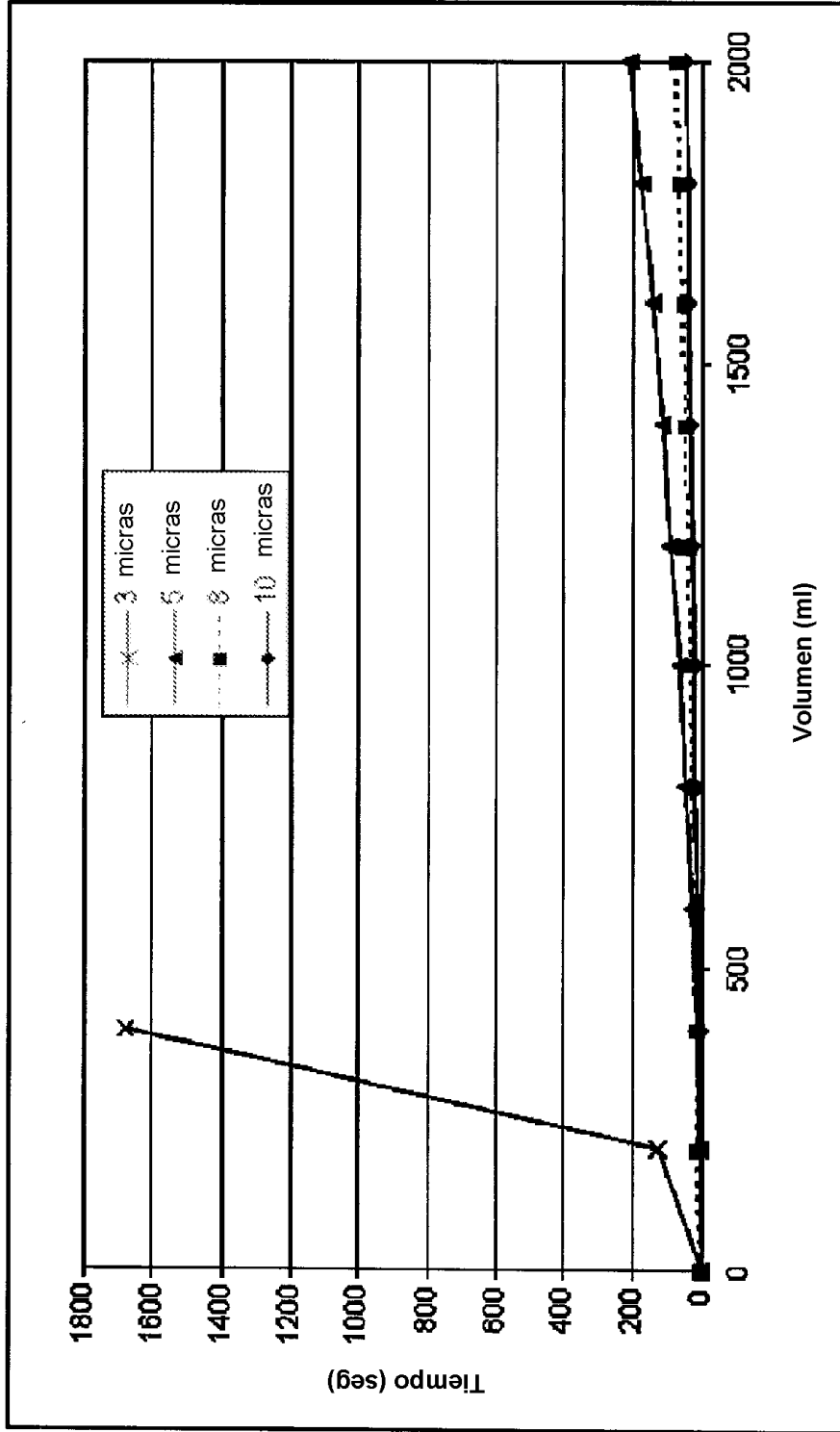


FIG. 4C. Filtrabilidad mejorada de una preparación de diutano carente de PHB
(diutano de PDD3/pS8 en agua de mar al 0,04%)

