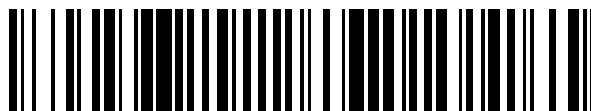


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 339**

51 Int. Cl.:

C12P 7/56 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2006** **E 06118331 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012** **EP 1760156**

54 Título: **Materiales y métodos para producción eficiente de ácido láctico**

30 Prioridad:

10.08.2005 US 706887

24.01.2006 US 761576

11.05.2006 US 799619

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

18.04.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
223 GRINTER HALL
GAINESVILLE, FL 32611, US**

72 Inventor/es:

**ZHOU, SHENGDE;
INGRAM, LONNIE O'NEAL;
SHANMUGAM, KEELNATHAM T.;
YOMANO, LORRAINE P.;
GRABAR, TAMMY B. y
MOORE, JONATHAN C.**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 401 339 T3

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

DESCRIPCIÓN

Materiales y métodos para producción eficiente de ácido láctico

5 Antecedentes de la invención

10 [0001] El ácido láctico se usa comúnmente como aditivo alimenticio para la conservación, el sabor y la acidez. El ácido láctico también se usa en la producción de plástico biodegradable, a saber, ácido poliláctico (PLA). El uso de PLA como alternativa renovable para productos a base de petróleo se está expandiendo rápidamente (Agrawal, 2003). Las propiedades físicas y el índice de degradación biológica del PLA se puede controlar mediante la manipulación de la proporción de los sustratos quirales, ácido láctico D y ácido láctico L (Narayanan *et al.*, 2004). El mercado global del ácido láctico se estima que tiene un exceso de 100.000 toneladas al año y se espera que aumente sustancialmente en los próximos años según empiecen a funcionar nuevas instalaciones de PLA.

15 [0002] Por ejemplo, la demanda de lactato de etilo solvente biodegradable (un derivado del ácido láctico) está previsto que aumente sustancialmente en un futuro próximo. Se estima que los ésteres de lactato podrían potencialmente reemplazar hasta el 80% de los 3,8 millones de toneladas de solventes que se usan cada año en EEUU. Este solvente no es tóxico y tiene muchas aplicaciones útiles, incluyendo la fabricación electrónica, pinturas y recubrimientos, tejidos, limpiadores y desengrasantes, adhesivos, impresión y destintado.

20 [0003] Los métodos fermentativos para producir ácido láctico suelen preferirse a la síntesis química, que produce una mezcla de los isómeros D y L. Los productos de fermentaciones microbiológicas dependen del organismo usado. La fermentación microbiológica puede producir una mezcla de los dos isómeros o ácido láctico ópticamente puro en una forma estereoespecífica. La estereoespecificidad deseada del producto depende del uso al que esté destinado.

25 [0004] Las fermentaciones bacterianas con lactobacilos son comunes en la producción industrial de ácido láctico, pero estas fermentaciones raramente producen un producto ópticamente puro. Adicionalmente, la naturaleza fastidiosa de estas bacterias requiere que se añadan cantidades considerables de nutrientes adicionales al medio de crecimiento, lo que supone un coste adicional y hace más difícil la purificación. Por otra parte, los métodos de fermentación para producir ácido láctico son altamente ineficientes y debe mejorarse para asegurar la viabilidad económica de las expansiones de mercado mencionadas anteriormente.

30 [0005] La levadura no es capaz de producir niveles apreciables de ácido láctico, aunque se han descrito cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes que contienen el gen de *ldh* de *Lactobacillus* o de orígenes bovinos (patente WO 99/14335 y Adachi *et al.*, 1998). A la vez que son capaces de producir hasta 2-4% (p/v) de ácido láctico, estas cepas muestran una productividad pobre y una parte significativa de la glucosa se convierte en etanol.

35 [0006] El *Rhizopus oryzae* de hongo filamentoso (sinónimo de *R. arrhizus*) también se usa para la producción industrial de ácido láctico. El *R. oryzae* es capaz de convertir aeróbicamente glucosa, en un medio químicamente definido, en grandes cantidades de ácido L-(+)-láctico ópticamente puro. La investigación en la producción de ácido láctico mediante *Rhizopus* ha continuado principalmente por la facilidad de purificación del producto en un medio de crecimiento mínimo y la capacidad del hongo para utilizar ambos carbohidratos complejos y azúcares de pentosa (patente estadounidense N°. 4.963.486). Esto permite que se utilice el hongo para la conversión de biomasa agrícola de bajo valor en ácido láctico. Desafortunadamente, la capacidad para modificar la producción de ácido láctico por modificación genética en el *Rhizopus* y otros hongos ha sido limitada.

40 [0007] Los biocatalizadores basados en la K-12 de *Escherichia coli* han sido creados genéticamente para la producción de D-(-)-lactato pero fueron incapaces de fermentar 10% de la glucosa o la sacarosa para complejarlas en el complejo o medio mínimo (Chang *et al.*, 1999 Dien *et al.*, 2001 Zhou *et al.*, 2003 Zhu y Shimizu 2004).

45 [0008] Uno de los biocatalizadores de *E. coli*, SZ63 (pLOI3501), se desarrolló para fermentación de sacarosa mediante expresión funcional de los genes *cscR' cscA' cscKB'* de *E. coli* B en un plásmido (Shukla *et al.* 2004). Aunque fue capaz de fermentación eficaz del 5% de glucosa o sacarosa, este biocatalizador metabolizó concentraciones de azúcar más altas de forma incompleta y se requirió selección antibiótica continua para el mantenimiento del plásmido.

50 [0009] Otros biocatalizadores derivados de la cepa B de *E. coli*, tales como K011 (número de depósito ATCC 55124), tienen la capacidad nativa de fermentar sacarosa (Moniruzzaman *et al.*, 1997). Como con la cepa SZ63, este biocatalizador metaboliza concentraciones de azúcar más altas de forma incompleta y se requiere selección antibiótica continua para el mantenimiento del plásmido.

55 [0010] Por consiguiente, sigue habiendo una necesidad de biocatalizadores de ácido láctico mejorados con aumento de los índices de fermentación, el título del producto y los rendimientos para reducir los costes asociados a la producción de base biológica de productos químicos (Arntzen *et al.*, 1999 Chotani *et al.*, 2000 Datta *et al.*, 1995 Hofvendahl y Hahn-Hagerdal, 2000 y Ohara *et al.*, 2001).

Breve resumen de la invención

[0011] La presente invención proporciona microorganismos nuevos útiles para la producción de ácido láctico. Adicionalmente, la presente invención proporciona constructos nuevos para su uso en la transformación de cualquiera de los numerosos organismos huésped, preferiblemente *Escherichia coli*, que expresan y/o suprimen genes determinados para producir ácido láctico cuando el organismo huésped se cultiva en un medio fermentable. Por consiguiente, los materiales y métodos de la presente invención pueden utilizarse para mejorar la producción del ácido láctico en organismos huésped, proporcionando de este modo un mayor suministro de ácido láctico para su uso en aplicaciones alimentarias e industriales.

[0012] En formas de realización determinadas, se construyen derivados del *Escherichia coli* etanológico (también denominados en este caso *E. coli*) K011 para la producción de D-(-)-lactato. En otras formas de realización de la invención, *E. coli* se crea genéticamente conforme a la presente invención para la producción de L-(+)-lactato.

[0013] Conforme a la presente invención, los nuevos biocatalizadores basados en K011 de *E. coli* se preparan mediante delección de los genes que codifican las vías rivales seguida de una selección basada en el crecimiento para mutantes con rendimiento mejorado para fermentar glucosa y/o sacarosa.

[0014] Los microbios creados genéticamente de la invención preferiblemente contienen genes nativos para la utilización de sacarosa. Ciertas cepas de *E. coli* creadas genéticamente de la invención pueden fermentar 10% de glucosa o sacarosa para producir más de 1 mol de D-(-)-lactato/1 de caldo de fermentación, con rendimientos basados en azúcar metabolizado que varía de aproximadamente 88% a aproximadamente 95%, dependiendo del caldo de fermentación. Otras cepas de *E. coli* creadas genéticamente de la invención pueden fermentar glucosa o sacarosa para producir L-(+)-lactato.

[0015] Se desprenderán más ventajas de esta invención de la descripción siguiente.

Breve descripción de las figuras

[0016]

Las figuras 1A-1F ilustran gráficamente la diferencia de actividad entre una forma de realización de la invención y la cepa SZ63.

Las figuras 2A-2D ilustran el progreso de la producción de ácido láctico de varias formas de realización de la invención bajo condiciones de fermentación en el medio de sales minerales NBS.

Las figuras 3A-3B ilustran la capacidad de la betaína para aumentar la tolerancia al ácido y al azúcar durante la producción de ácido láctico mediante una forma de realización de la invención.

Las figuras 4A-4B ilustran la capacidad de una forma de realización de la invención para aclimatarse a los medios minerales.

Las figuras 5A-5G ilustran el progreso de la producción de ácido láctico por otra forma de realización de la invención bajo varias condiciones de fermentación.

Breve descripción de las secuencias

[0017]

SEQ ID nº: 1 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para delección de *frdBC*.

SEQ ID nº: 2 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para delección de *frdBC*.

SEQ ID nº: 3 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para delección de *adhE*.

SEQ ID nº: 4 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para delección de *adhE*.

SEQ ID nº: 5 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para delección de *celY*.

SEQ ID nº: 6 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para delección de *celY*.

SEQ ID nº: 7 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para delección de *mgsA*.

SEQ ID nº: 8 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para delección de *mgsA*.

SEQ ID nº: 9 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para amplificación de FRT-cat-sacB.

SEQ ID nº: 10 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para amplificación de FRT-cat-sacB.

SEQ ID nº: 11 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para amplificación de cat-sacB con el sitio NheI 5'.

SEQ ID nº: 12 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para amplificación de cat-sacB con el sitio NheI 5'.

SEQ ID nº: 13 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para clonación de *frdABCD*.

SEQ ID nº: 14 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para clonación de *frdABCD*.

SEQ ID nº: 15 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para clonación de *ackA*.

SEQ ID nº: 16 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para clonación de ackA.
 SEQ ID nº: 17 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para clonación de lacZ-cynX.
 SEQ ID nº: 18 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para clonación de lacZ-cynX.
 SEQ ID nº: 19 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para clonación de mgsA.
 5 SEQ ID nº: 20 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para clonación de mgsA.
 SEQ ID nº: 21 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para clonación de focA-pflB.
 SEQ ID nº: 22 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para clonación de focA-pflB.
 SEQ ID nº: 23 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para clonación de adhE.
 SEQ ID nº: 24 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para clonación de adhE.
 10 SEQ ID nº: 25 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para delección de frdBC.
 SEQ ID nº: 26 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para delección de frdBC.
 SEQ ID nº: 27 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para delección de ackA.
 SEQ ID nº: 28 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para delección de ackA.
 SEQ ID nº: 29 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido lacZ con el sitio NheI 5'.
 15 SEQ ID nº: 30 es la secuencia de nucleótidos para un cebador cynX antisentido con el sitio NheI 5'.
 SEQ ID nº: 31 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para delección de mgsA.
 SEQ ID nº: 32 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para delección de mgsA.
 SEQ ID nº: 33 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para delección de focA-pflB.
 SEQ ID nº: 34 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para delección de focA-pflB.
 20 SEQ ID nº: 35 es la secuencia de nucleótidos para un cebador de sentido para delección de adhE.
 SEQ ID nº: 36 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para delección de adhE.

SEQ ID nº: 37-46 representan la secuencia parcial de las regiones genéticas en las que se eliminaron las cicatrices FRT. Las secuencias parciales de las regiones 5' y 3' del gen(es) se muestran en negrita, la cursiva se utiliza para designar la cicatriz FRT y la región subrayada se eliminó en la cepa TG128.
 25

Descripción detallada de la invención

[0018] La presente invención proporciona microorganismos nuevos que son capaces de producir ácido láctico cuando se cultivan en una variedad de condiciones de fermentación. La presente invención también proporciona métodos para crear tales microorganismos así como métodos para producir ácido láctico de forma estable y eficiente usando los nuevos microbios de la invención, de modo que se proporciona un rendimiento elevado de ácido láctico a partir de materias primas relativamente poco costosas tales como glucosa o sacarosa.
 30

[0019] El término "ácido láctico" en esta solicitud se refiere a ácido 2-hidroxipropiónico ya sea en el ácido libre o en forma de sal. La forma de sal de ácido láctico se denomina "lactato" independientemente del agente de neutralización, es decir, carbonato cálcico o hidróxido amónico. En este caso, el ácido láctico puede referirse a cualquier forma estereoisomérica de ácido láctico (ácido L-(+)-láctico o ácido D-(-)-láctico). El término lactato puede referirse a cualquier forma estereoisomérica de lactato (L-(+)-lactato o D-(-)-lactato). La presente invención proporciona microbios que producen un único estereoisómero de ácido láctico o lactato. El estereoisómero de ácido láctico o estereoisómero de lactato que se produce conforme a algunos aspectos de esta invención es "quiralmente puro". La frase "quiralmente puro" indica que no hay contaminación detectable entre una forma estereoisomérica de ácido láctico o lactato y la otra forma estereoisomérica (la pureza quiral del estereoisómero específico es al menos mayor de (o mayor de o igual a) 99,9%). Los microorganismos genéticamente modificados descritos en la presente a los que se les ha eliminado o desactivado la ruta del metilglicoxal (mgsA) son capaces de producir ácido D-(-)-láctico o ácido L-(+)-láctico "quiralmente puro".
 35
 40
 45

[0020] Para ciertas formas de realización de la invención, ácido L-(+)-láctico se produce usando los microbios creados genéticamente de la invención. En otras formas de realización de la invención, ácido D-(-)-láctico se produce usando los microbios creados genéticamente de la invención.
 50

[0021] En una forma de realización, la invención usa *Escherichia coli* (o *E. coli*) como biocatalizador para la conversión mejorada de glucosa y/o sacarosa en ácido láctico. Conforme a la presente invención, el metabolismo de un microorganismo se puede modificar por introducción y expresión de varios genes. Conforme a la presente invención, se pueden introducir varios plásmidos nuevos en el *E. coli* de modo que el microorganismo transformado pueda producir grandes cantidades de ácido láctico en varias condiciones de fermentación. El *E. coli* recombinante de la invención se modifica preferiblemente de modo que el ácido láctico se produzca de forma estable con rendimiento elevado cuando se cultiva en un medio que comprende glucosa y/o sacarosa.
 55

[0022] Los huéspedes de *E. coli* que contienen los plásmidos de la presente invención se depositaron en el Agricultural Research Service Culture Collection, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604 U.S.A. Los números de registro y fechas de depósito son los siguientes:
 60

Cultivo	Número de acceso	Fecha de depósito
SZ132	NRRL B-30861	3 de agosto de 2005
SZ186	NRRL B-30862	3 de agosto de 2005
SZ194	NRRL B-30863	3 de agosto de 2005
TG103	NRRL B-30864	9 de agosto de 2005
TG102	NRRL B-30921	5 de mayo de 2006
TG105	NRRL B-30922	5 de mayo de 2006
TG106	NRRL B-30923	5 de mayo de 2006
TG107	NRRL B-30924	5 de mayo de 2006
TG108	NRRL B-30925	5 de mayo de 2006
TG112	NRRL B-30926	5 de mayo de 2006
TG113	NRRL B-30927	5 de mayo de 2006
TG114	NRRL B-30928	5 de mayo de 2006
TG128	NRRL B-30962	25 de julio de 2006
TG129	NRRL B-30963	25 de julio de 2006
TG130	NRRL B-30964	25 de julio de 2006

[0023] Los cultivos en cuestión se han depositado bajo condiciones que garantizan que el acceso a los cultivos esté disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente para que alguien determinado por el *Commissioner of Patents and Trademarks* (Comisionado de Patentes y Marcas) tenga derecho a ello bajo 37 CFR 1.14 y 35 USC 122. Las depósitos están disponibles como exigen las leyes de patentes extranjeras en los países donde se han solicitado homólogas de la presente solicitud o su progenie. No obstante, se debe entender que la disponibilidad de los depósitos no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patente concedidos por la acción gubernamental.

[0024] Además, estos depósitos de cultivo se almacenarán y se pondrán a disposición del público según lo establecido en el Tratado de Budapest para el depósito de microorganismos, es decir, se almacenarán con todo el cuidado necesario para mantenerlos viables y sin contaminación durante un periodo de al menos cinco años después de la última solicitud de almacenamiento de una prueba de los depósitos y, en cualquier caso, durante un periodo de al menos 30 (treinta) años después de la fecha de depósito o durante la vida ejecutable de cualquier patente que pueda emitir la divulgación de los cultivos. El depositante reconoce el deber de reemplazar los depósitos si el depositario no pudiera proporcionar una muestra cuando se solicitara, debido a la condición de los depósitos. Toda restricción de la disponibilidad al público de los depósitos de cultivo objeto desaparecerá irrevocablemente por la concesión de una patente que los divulgue.

[0025] Una forma de realización de la presente invención proporciona una cepa B de *E. coli* ("SZ132"; nº de depósito: NRRL B-30861) que se crea genéticamente para mejorar el crecimiento celular y la producción de lactato en varios medios. En una forma de realización, la cepa SZ132 se puede construir para producir D-lactato (ácido láctico) mediante los siguientes pasos:

- (a) construcción de la cepa LY52 de *E. coli* K011 integrando los genes *casAB* de *Klebsiella oxytoca* (nº de depósito: ATCC 68564) para utilización de celobiosa detrás del codón de terminación de *lacY* e integrar el gen *celY* de *Erwinia chrysanthemi* (nº de depósito: ATCC 55124) que codifica endoglucanasa en el gen *frdA* (Ohta *et al.*, 1991 Moniruzzaman *et al.*, 1997 Zhou e Ingram, 1999);
 - (b) transducción consecutiva a LY52 de determinadas mutaciones en *E. coli* K-12 (cepa W3110), que se usaron para construir la cepa SZ63 (Zhou *et al.*, 2003);
 - (c) delección de genes de *Z. mobilis* para producir etanol por transducción de P1 de la delección Δ focA-pflB de la cepa SZ31 (cepa W3110);
 - (d) inactivación de la producción de alcohol deshidrogenasa de *E. coli* nativa por transducción de P1 de la mutación *adhE* de la cepa TC20 (Zhou *et al.*, 2003);
 - (e) delección de la quinasa de acetato (*ackA*) usando la mutación de la cepa SZ61 (cepa W3110) (Zhou *et al.*, 2003);
 - (f) delección de los genes antibióticos que se usaron para la selección por recombinasa FLP (Zhou *et al.*, 2003);
- y

(g) durante la delección de los genes antibióticos del paso (f), delección de un segmento interno de casAB (o delección de un segmento interno del gen casAB después del paso de delección de los genes antibióticos).

5 [0026] Las formas de realización relacionadas con la invención además incluyen la transformación de la cepa SZ132 para eliminar todos los genes foráneos. En una forma de realización, se eliminaron los genes *celY* de *Klebsiella oxytoca* y *Erwinia chrysanthemi* de la cepa SZ132 por recombinación homóloga usando ADN lineal; luego la recombinasa FLP se usó para eliminar los genes antibióticos usados durante la construcción de la cepa SZ132. La cepa resultante, SZ186 (nº de depósito: NRRL B-30862), contiene sólo los genes de *E. coli* nativos.

10 [0027] Otra forma de realización de la presente invención proporciona una cepa B de *E. coli* ("TG103" nº de depósito: NRRL B- 30864) que se crea genéticamente para mejorar el crecimiento celular y la producción del isómero L de ácido láctico en varios medios. En una forma de realización, la cepa TG103 se puede construir mediante los siguientes pasos:

15 (a) crear genéticamente la cepa SZ186 utilizando métodos como los descritos en este caso;
 (b) someter a la cepa SZ186 a cultivo en serie para seleccionar crecimiento aumentado y/o producción de ácido láctico aumentada, donde las cepas seleccionadas son la cepa SZ194 (nº de depósito: NRRL B-30863);
 (c) integrar un gen de ácido láctico L heterólogo y un marcador de canamicina en el gen nativo *ldhA* (D-lactato-deshidrogenasa) de SZ194 y eliminar la parte central de la región codificante para producir TG101;
 20 (d) eliminar los genes antibióticos por recombinasa FLP para producir TG102 (número de depósito: NRRL B-30921); y
 (e) someter a la cepa TG102 a transferencia en serie durante varios días (tal como aproximadamente de 7 a 21 días, preferiblemente durante 13 días), con una dilución 1:100 de caldo de cultivo previamente inoculado cada día y seleccionar las cepas que demuestran crecimiento mejorado y/o producción de ácido láctico L aumentada, donde las cepas seleccionadas son TG103.

25 [0028] Según ciertas formas de realización de la presente invención, el crecimiento aumentado y la producción de ácido láctico aumentada están enlazadas. El proceso de coselección para cepas con crecimiento y producción de ácido láctico mejorados se denomina "evolución metabólica". Ciertas formas de realización de la invención también proporcionan la inactivación o la delección de determinados genes en los organismos genéticamente modificados que proporciona esta
 30 solicitud. En un aspecto de la invención, los genes se eliminan para inactivar la actividad deseada. Las delecciones proporcionan estabilidad máxima porque no hay posibilidad de que una mutación inversa restablezca la función. Alternativamente, los genes se puede inactivar por inserción de secuencias de ácido nucleico que disgregan la función y/o la expresión del gen (p. ej., transducción de P1 u otros métodos conocidos en la técnica). La inactivación o la delección de una o más secuencia de polinucleótidos particulares como se ha tratado aquí puede también denominarse
 35 "modificaciones" genéticas.

[0029] El vector usado para introducir genes específicos en un microorganismo huésped puede ser cualquier vector siempre que pueda replicarse en el microorganismo huésped. Los vectores de la presente invención puede ser operables como vectores de clonación o vectores de expresión en la célula huésped seleccionada. Los profesionales
 40 expertos en la técnica conocen numerosos vectores, y la selección de un vector y célula huésped apropiados es cuestión de elección. Los vectores pueden ser, por ejemplo, bacteriófagos, plásmidos, virus o híbridos de los mismos, tales como los descritos en Maniatis *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1995; Miller, J.H., 1992; Sambrook y Russell, 2001. Además, los vectores de la invención pueden ser vectores de no fusión o vectores de fusión.

45 [0030] Dentro de cada vector específico, se pueden seleccionar varios sitios para insertar una secuencia de nucleótidos de interés. Estos sitios normalmente están designados por la enzima de restricción o endonucleasa que los corta. El vector se puede digerir con una enzima de restricción coincidente con la secuencia terminal del gen y las secuencias se pueden ligar. El ligamiento normalmente se logra usando una ligasa tal como T4 DNA ligasa.

50 [0031] El sitio particular elegido para la inserción del fragmento nucleótido seleccionado en el vector para formar un vector recombinante se determina por una variedad de factores. Estos incluyen tamaño y estructura del polipéptido que se va a expresar, susceptibilidad del polipéptido deseado para degradación enzimática por los componentes de la célula huésped y contaminación por sus proteínas, características de expresión tales como la ubicación de los codones de
 55 inicio y de parada y otros factores reconocidos por los expertos en la técnica. Ninguno de estos factores por sí solo controla absolutamente la elección del sitio de inserción para un polipéptido particular. Más bien, el sitio elegido refleja un equilibrio de estos factores y no todos los sitios pueden ser igualmente eficaces para una proteína dada.

[0032] En la práctica de esta invención se pueden emplear una variedad de sistemas de expresión vector-célula huésped. Las cepas de bacterias, tales como *E. coli*, son particularmente útiles para la producción de ácido láctico en la
 60 práctica de la invención. No obstante, la nueva invención descrita en la presente se puede aplicar con numerosos huéspedes que serían deseables para varios esquemas de producción de ácido láctico. Las cepas huésped pueden ser de origen bacteriano, fúngico o de levadura. Factores que se puede considerar en la elección de las cepas huésped incluyen rango de sustrato, vigor, tolerancia al azúcar, tolerancia a la sal, tolerancia a la temperatura, tolerancia al pH y tolerancia al lactato. La determinación del sistema más apropiado huésped-vector está en la habilidad del experto en la
 65 técnica.

[0033] Los métodos para delección e integración cromosómica y los genes de resistencia antibiótica eliminables se han descrito previamente (Causey *et al.*, 2004; Datsenko y Wanner, 2000; Martinez-Morales *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2003). Cualquiera de ellos o combinación de tales métodos conocidos se puede emplear en la práctica de la presente invención.

[0034] Este promotor se puede usar como promotor para la expresión del gen(s) que se va a presentar en el microorganismo huésped (por ejemplo, los genes *casAB* de *K. oxytoca* o *celY* de *E. chrysanthemi*) cuando un promotor específico para el gen funciona en las células huésped. Alternativamente, también es posible enlazar un promotor foráneo a un ADN que codifica el gen para obtener la expresión bajo el control del promotor. Se puede usar como tal promotor, cuando se usa una *Escherichia bacterium* como huésped, el promotor *lac*, el promotor *trp*, el promotor *trc*, el promotor *tac*, el promotor P_R y el promotor P_L de fago de *lambda*, el promotor *tet*, el promotor *amyE*, el promotor *spac*, etcétera. Además, también es posible usar un vector de expresión que contenga un promotor como *pUC19*, e insertar un fragmento de ADN, codificando por ejemplo *casAB* de *K. oxytoca*, en el vector de modo que el fragmento se pueda expresar bajo el control del promotor.

[0035] Los métodos para preparación de ADN cromosómico, PCR, preparación de ADN de plásmido, digestión y ligamiento de ADN, transformación, diseño y síntesis de oligonucleótidos usados como cebadores, etcétera, pueden ser métodos usuales bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos se describen en, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.* (1989), entre otros.

[0036] El ácido láctico se puede producir permitiendo que un microorganismo transformado, como se ha descrito anteriormente, convierta glucosa y/o sacarosa en ácido láctico y recolectando el ácido láctico producido. En un aspecto de la invención, el ácido láctico se puede producir a niveles mayores de 0,5M cuando los organismos transformados se cultivan en un medio de sales minerales, tal como el medio de sales mineral NBS.

[0037] Los vectores de la invención se pueden replicar de manera autónoma o integrar en el genoma del huésped. La integración ocurre típicamente por recombinación homóloga (por ejemplo, marcador seleccionable de arginina que se integra en el gen de arginina cromosómica) o en un sitio cromosómico no relacionado con ningún gen del vector. La integración puede ocurrir tanto por un evento único como por un evento de doble cruce. También es posible tener cualquier número de estos tipos de integración y de replicación ocurriendo en el mismo microorganismo construido.

[0038] En formas de realización determinadas, el cultivo de los microorganismos creados genéticamente de la invención se realiza bajo condiciones aeróbicas durante aproximadamente de 0,5 a 240 horas. La temperatura de cultivo se controla preferiblemente a aproximadamente de 25°C a 45°C y el pH se controla preferiblemente a 5-8 durante el cultivo. Las sustancias inorgánicas u orgánicas, ácidas o alcalinas, así como el gas de amoníaco o similares se pueden usar para ajustar el pH.

[0039] El microorganismo de la presente invención se puede obtener por transformación de una bacteria perteneciente a *Escherichia* para expresar determinadas enzimas útiles en la producción de ácido láctico. En una forma de realización preferida, una bacteria perteneciente a *Escherichia* que se puede usar en la presente invención es *Escherichia coli*.

[0040] En otras formas de realización de la invención, la bacteria que se puede usar en la presente invención incluye, entre otras, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Sporosarcina amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*, *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantium*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Micrococcus sp. CCM825*, *Morganella morganii*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovolans*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas teststeroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus sp. ATCC 15592*, *Rhodococcus sp. ATCC 19070*, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio tyrogenes*, *Actinomyces madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flavelus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmulleri*, *Xanthomonas citri*, etcétera.

[0041] El ácido láctico se puede producir en una mezcla reactiva poniendo en contacto un cultivo que contiene microorganismos transformados preparado según la presente invención con sacarosa y/o glucosa. En otras formas de realización de la invención, se separan células y se recogen de un cultivo de microorganismos transformados; las células de microorganismos transformados procesadas se someten a tratamiento de acetona o liofilización; un extracto libre de células preparado a partir de tales células de microorganismos transformados o células procesadas; fracciones tales como fracciones de membrana divididas de tal extracto libre de célula o materiales inmovilizados se pueden producir mediante la inmovilización de células de microorganismos transformados, células procesadas, extractos y fracciones libres de células, cualquiera de los cuales, de forma independiente o combinada, entran en contacto con sacarosa y/o glucosa para producir ácido láctico. El microorganismo puede consistir en una especie de microorganismo, o se puede usar como una mezcla arbitraria de dos o varios tipos de microorganismos.

[0042] Los parámetros de fermentación dependen del tipo de organismo huésped usado para producir la enzima recombinante. El medio de crecimiento puede ser mínimo/definido o completo/complejo. Las fuentes de carbono fermentables podrían incluir azúcares de hexosa y de pentosa, almidón, celulosa, xilano, oligosacáridos y combinaciones de los mismos. Una forma de medios de crecimiento que se puede usar conforme a la presente invención incluye caldo Luria-Bertani modificado (LB) (con 10 g de triptona Difco, 5 g de extracto de levadura Difco y 5 g de cloruro sódico por litro) como está descrito por Miller J.H. (1992). En otras formas de realización de la invención, los cultivos de las cepas construidas de la invención se pueden cultivar en el medio de sales minerales NBS (como se describe por Causey *et al.*, 2004) y suplementar con 2% a 20% de azúcar (p/v) o bien 5% o 10% de azúcar (glucosa o sacarosa). Los microorganismos se puede cultivar en el medio de sales minerales NBS. El medio de sales minerales NBS comprende, consiste esencialmente en o consiste en los siguientes componentes (por litro): 3,5 g de KH_2PO_4 ; 5,0 g de K_2HPO_4 ; 3,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 15 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 mg de tiamina; y 1 ml de caldo de metal traza, glucosa (p. ej., 2% en placas o 3% en el caldo) y 1,5% de agar (para placas). El caldo de metales traza se prepara en 0,1 M de HCl y comprende, consiste esencialmente en o consiste en (por litro): 1,6 g de FeCl_3 ; 0,2 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de CuCl_2 ; 0,2 g de $\text{ZnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de NaMoO_4 ; 0,05 g de H_3BO_3 . Se puede añadir ácido 4-Morfolinopropanosulfónico (0,1 M, pH 7,1) tanto a los líquidos como a los medios sólidos (esterilizado por filtro) cuando se necesita para el control del pH (y se incluye opcionalmente en el medio usado para fermentaciones de 10 litros). El medio mínimo se puede preparar también usando succinato (1 g/litro-1) como única fuente de carbono (sustrato no fermentable) y se puede agregar como suplemento al medio mínimo de glucosa cuando es necesario. En formas de realización determinadas, los antibióticos se puede incluir como necesarios para construir la cepa.

[0043] El crecimiento y la producción del lactato se puede realizar en fermentaciones de lote normales, fermentaciones alimentadas o fermentaciones continuas. En determinadas formas de realización, es deseable realizar fermentaciones con oxígeno reducido o condiciones anaeróbicas para ciertos huéspedes. En otras formas de realización, la producción de lactato se puede realizar con oxígeno; y, opcionalmente con el uso de fermentadores de elevación por aire o equivalentes.

[0044] El pH de la fermentación debería ser suficientemente alto para permitir el crecimiento y la producción de lactato mediante el huésped. El ajuste del pH del caldo de fermentación se puede realizar usando agentes neutralizantes tales como carbonato cálcico o hidróxidos. Alternativamente, el ácido láctico se puede eliminar continuamente durante la fermentación usando métodos tales como tecnología de membrana, electro-diálisis, extracción de solvente y resinas absorbentes. La selección y la incorporación de cualquiera de los métodos fermentativos anteriores es altamente dependiente de la cepa huésped y del proceso aguas abajo preferido.

[0045] Varias formas de realización no exclusivas de la presente invención incluyen:

1. Una cepa de *E. coli* modificada genéticamente que comprende las siguientes modificaciones genéticas para la cepa de *E. coli* KO11 (ATCC 55124): a) inserción del gen *casAB* de *Klebsiella oxytoca* detrás del codón de terminación de *lacY*; b) integración del gen *celY* de *Erwinia chrysanthemi* en el gen *frdA*; c) inactivación o delección del *focA-Z. mobilis* *pdhB*-*adhB*-*pflB*; d) inactivación o delección del gen de alcohol deshidrogenasa de *E. coli* nativo; y e) inactivación o delección del gen de acetato-quinasa (*ackA*);
2. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 1, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada comprende además genes de resistencia antibiótica inactivados o eliminados;
3. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 1, donde el gen *casAB* de *Klebsiella oxytoca* y el gen *celY* de *Erwinia chrysanthemi* se inactivan o eliminan en dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada después de la inserción;
4. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 2, donde el gen *casAB* de *Klebsiella oxytoca* y el gen *celY* de *Erwinia chrysanthemi* se inactivan o eliminan en dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada después de la inserción;
5. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 2, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se desarrolla metabólicamente;
6. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 1 o forma de realización 3, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se desarrolla metabólicamente;
7. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 4, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se desarrolla metabólicamente;

8. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, donde los genes antibióticos se eliminan con recombinasa FLP;
9. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 7, donde dicha cepa de *E. coli* modificada genéticamente es SZ186 (NRRL B-30862);
- 5 10. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 5, donde dicha cepa de *E. coli* modificada genéticamente es SZ132 (NRRL B-30861);
11. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 1, 2, 3, 4 o 5, donde el gen *mgsA* de dicha cepa se inactiva o elimina de dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada;
12. Una cepa de *E. coli* genéticamente modificada que comprende la cepa de *E. coli* SZ194 (NRRL B30863) en la que el gen *mgsA* se ha inactivado o eliminado;
- 10 13. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 12, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se desarrolla metabólicamente;
14. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 13, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es TG112 (NRRL B-30926), TG113 (NRRL B-30927) o TG114 (NRRL B-30928);
- 15 15. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 11 o 12, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada comprende además un gen *ldhA* inactivado o eliminado nativo y un gen heterólogo insertado de manera recombinante que codifica una lactato deshidrogenasa L-específica;
16. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 15, donde dicho gen heterólogo de lactato dehidrogenasa L-específica es un gen *ldhL* (por ejemplo, un gen *ldhL* obtenido de *P. acidilactici*);
- 20 17. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 15 o forma de realización 16, donde dicha cepa se desarrolla metabólicamente;
18. Una cepa de *E. coli* genéticamente modificada seleccionada de TG112 (NRRL B-30926), TG113 (NRRL B-30927) o TG114 (NRRL B-30928), SZ194 (NRRL B-30863), SZ132 NRRL B-30861), SZ186 (NRRL B-30862), o TG103 (NRRL B- 30864);
- 25 19. Un método de cultivo de una cepa de *E. coli* genéticamente modificada que comprende la inoculación de un medio de cultivo con una o más cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquiera de las formas de realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 y cultivo de dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada;
- 30 20. Un método para producir D-(-)-lactato o ácido D-(-)-láctico que comprende cultivo de una o más cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquiera de las formas de realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 bajo condiciones que permitan la producción de ácido D-(-)-láctico y opcionalmente neutralización del ácido D-(-)-láctico para formar D-(-)-lactato;
21. El método según la forma de realización 20, donde dicha cepa o cepas de *E. coli* genéticamente modificadas se seleccionan de TG112 (NRRL B-30926), TG113 (NRRL B-30927), TG114 (NRRL B-30928) o SZ194 (NRRL B-30863);
- 35 22. Un método para producir L-(+)-lactato o ácido L-(+)-láctico que comprende cultivo de una o más cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquiera de las formas de realización 15, 16 o 17 bajo condiciones que permitan la producción de ácido L-(+)-láctico y opcionalmente neutralización del ácido L-(+)-láctico para formar L-(+)-lactato;
- 40 23. El método según la forma de realización 22, donde dicha cepa o cepas genéticamente modificadas de *E. coli* son TG103 (NRRL B-30862), TG105 (NRRL B-30862), TG106 (NRRL B-30862), TG107 (NRRL B-30862), o TG108 (NRRL B-30862);
24. El método según cualquiera de las formas de realización 19, 20, 21, 22 o 23, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se cultiva en un medio de sales minerales;
- 45 25. El método según la forma de realización 24, donde el medio de sales minerales comprende entre 2% y 20% (p/v) de un azúcar;
26. El método según la forma de realización 25, donde el medio de sales minerales contiene 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% o 20% (p/v) de un azúcar;
- 50 27. El método según la forma de realización 25 o 26, donde el azúcar es glucosa o sacarosa o una combinación de glucosa y de sacarosa;
28. El método según la forma de realización 20, donde una cepa de *E. coli* genéticamente modificada como se establece en la forma de realización 11 se cultiva bajo condiciones que permitan la producción de D-(-)-lactato o ácido D-(-)-láctico quiralmente puro;
- 55 29. El método según la forma de realización 22, donde una cepa de *E. coli* genéticamente modificada como se establece en la forma de realización 15, 16 o 17 se cultiva bajo condiciones que permitan la producción de L-(+)-lactato o L- (+)-láctico ácido quiralmente puro;
30. El método según la forma de realización 21, donde dicho método produce D-(-)-lactato o ácido D-(-)-láctico quiralmente puro;
- 60 31. El método según la forma de realización 23, donde dicho método produce L-(+)-lactato o ácido L-(+)-láctico quiralmente puro;
32. El método según la forma de realización 28, 29, 30 o 31, que comprende además el paso de purificación del lactato quiralmente puro (L-(+)-lactato o D-(-)-lactato);
- 65 33. El método según cualquiera de las formas de realización 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32, donde el lactato (p. ej., el L-(+)-lactato o D-(-)-lactato) se produce en concentraciones de al menos 0,5M;

34. El método según la forma de realización 33, donde el medio de cultivo es un medio de sales minerales químicamente definido tal como el medio de sales minerales NBS;

35. El método según la forma de realización 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34, donde el rendimiento del ácido láctico (ácido L-(+)-láctico o ácido D-(-)-láctico) es al menos de o superior a (o superior a o igual a) 90%;

36. El método según la forma de realización 35, donde el rendimiento es de al menos 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% o 99%;

37. El método según la forma de realización 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36, donde no hay contaminación detectable de una forma estereoisomérica de ácido láctico o lactato con la otra forma estereoisomérica (p. ej., la pureza quiral del estereoisómero específico es de al menos, mayor de (o mayor de o igual a) 99,9%)); o

38. Una composición que comprende una o más cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquiera de las formas de realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 y el medio.

[0046] A continuación se muestran los ejemplos que ilustran los procedimientos para la práctica de la invención. Estos ejemplos no deberían interpretarse como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de solvente son en volumen a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

Preparación y análisis de las cepas de *E. coli* SZ132 y SZ 186

[0047] Las cepas de *E. coli* usadas en este ejemplo se enumeran en la Tabla 1. La cepa SZ63 es un derivado de *E. coli* K-12 (ATCC 27325). KO11 (ATCC 55124) es un derivado de *E. coli* B (ATCC 11303) que contiene los genes de producción de etanol de *Zymomonas mobilis* integrados en el gen *pflB*.

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i>		
Cepas	Características relevantes	Fuentes
DH5α	<i>ΔlacZ M15 recA</i>	Invitrogen
S17-1	<i>thi pro recA hsdR RP4-2-tet::Mu aphA::Tn7 λpir</i>	Simon <i>et al.</i> 1983
TC20	<i>ΔadhE::FRT-tet-FRT</i>	Zhou <i>et al.</i> 2003
SZ31	W3110, <i>Δ(focA-pflB)::FRT-kan-FRT</i>	Zhou <i>et al.</i> 2003
SZ61	W3110, <i>ΔackA::FRT-tet-FRT</i>	Zhou <i>et al.</i> 2003
SZ63	W3110, <i>ΔfocA-pflB::FRT Δfrd ΔadhE::FRT ΔackA::FRT</i>	Zhou <i>et al.</i> 2003
NC3	<i>E. coli</i> B/r, <i>hsdR</i>	Dien <i>et al.</i> 2001
KO11	<i>pflB::Z. mobilis pdc adhB cat, Δfrd</i>	Ohta <i>et al.</i> 1991
LY52	KO11, <i>frdA::K. oxytoca casAB, lacY::E. chrysanthemi celY</i>	Este ejemplo
SZ132	LY52, <i>Δ(focA-pdc-adhB-pflB) ΔadhE::FRT ΔackA::FRT, ΔcasA</i>	Este ejemplo
SZ186	SZ132, <i>ΔK. oxytoca casAB ΔE. chrysanthemi celY</i>	Este ejemplo

[0048] Se realizaron cultivos a 37°C en el caldo Luria-Bertani (LB) modificado (por litro: 10 g de triptona Difco, 5 g de extracto de levadura Difco, 5 g de cloruro sódico) o en el medio de sales minerales NBS suplementado con 5% o 10% de azúcar (glucosa o sacarosa). Se incluyeron antibióticos según fue necesario para construcciones de cepas.

[0049] Se usaron métodos estándar para construcción de plásmidos. Los métodos para delecciones cromosómicas, integración y los genes de resistencia antibiótica eliminables se han descrito previamente. Se usaron las cepas de *E. coli* DH5α y S17-1 como huéspedes para la construcción de plásmidos. La cepa NC3 se usó como huésped intermedio para minimizar los problemas asociados a las enzimas de restricción durante la transducción de P1 desde las cepas K-12 a las cepas B (Dien *et al.*, 2001).

[0050] Se prepararon cultivos de siembra de la manera descrita previamente por Shukla *et al.* (2004) y Zhou *et al.*, (2003) y se usaron para inocular pequeños recipientes de fermentación (350 ml de volumen de trabajo, 35°C, agitación a 150 r.p.m.). El caldo se mantuvo a pH 7,0 mediante la adición automática de 6 N de KOH. Los datos mostrados representan un promedio de 2 o varias réplicas. Las barras que denotan el error típico del medio se incluyen para promedios de 3 o más fermentaciones. La productividad máxima volumétrica para el lactato se estimó con respecto a la región más empinada de cada gráfico. No se incluyó ninguno de los antibióticos durante la producción de los cultivos de siembra o en los caldos de fermentación.

[0051] La masa celular se estimó por densidad óptica de medición a 550 nm (330 mg de célula seca p/L a 1,0 OD_{550nm}). La producción de ácido orgánico total (principalmente lactato) se midió por consumo de base (KOH). Los productos ácidos se analizaron al final de la fermentación por cromatografía en fase líquida de alta eficacia. Se midió el etanol por cromatografía de gases.

Construcción de la cepa SZ132

[0052] La cepa LY52 se construyó a partir de KO11 mediante la integración de los genes casAB de *Klebsiella oxytoca* (Moniruzzaman *et al.* 1997) para utilización de celobiosa detrás del codón de terminación de lacY y la integración del gen celY de *Erwinia chrysanthemi* que codifica la endoglucanasa (Zhou e Ingram, 1999) en el gen frdA. Las mutaciones previamente caracterizadas en la K-12 de *E. coli* (cepa W3110) usada para construir SZ63 (Zhou *et al.*, 2003) para la producción de lactato fueron consecutivamente transducidas a los genes LY52. *Z. mobilis* para la producción de etanol y fueron eliminadas por transducción de P1 de la delección Δ focA pflB de SZ31. La alcohol deshidrogenasa de *E. coli* nativa se inactivó por transducción de P1 de la mutación adhE de TC20. Se eliminó la acetato quinasa (ackA) usando la mutación en SZ61. Los genes antibióticos usados para la selección se eliminaron por recombinasa FLP (Zhou *et al.*, 2003). Durante la delección de los genes antibióticos con recombinasa FLP, también se eliminó un segmento interno de casAB. El análisis de secuencias de casAB y del promotor reveló la presencia de regiones de ADN muy similares al sitio de reconocimiento para recombinasa FLP y se sospecha que son responsables de esta delección.

[0053] La cepa resultante se aclimató a los medios mínimos por subcultivo consecutivo con un 1% de inóculo. Tanto el cultivo celular como la producción de lactato mejoró durante estas transferencias. El caldo de la última transferencia se estrió en el medio sólido para el aislamiento de los clones. Se seleccionó uno y se designó SZ132 (NRRL B-30861).

Construcción de la cepa SZ186

[0054] Se construyó otro derivado de SZ132 en el que se eliminaron todos los genes foráneos. Los genes casAB de *K. oxytoca* y celY de *E. chrysanthemi* se eliminaron por recombinación homóloga usando ADN lineal. Se usó la recombinasa FLP para eliminar los genes antibióticos usados durante las construcciones. La cepa resultante, SZ186 (NRRL B-30862), contiene sólo genes de *E. coli* nativos.

Análisis de la producción de ácido láctico

[0055] Las mutaciones genéticas análogas se construyeron en derivados de *E. coli* K-12 y *E. coli* B para producir SZ63 (Zhou *et al.*, 2003) y SZ132, respectivamente. SZ132 fue superior a SZ63 en cuanto a crecimiento celular y producción de lactato (isómero D) (véase la figura 1A). En el medio rico, SZ132 completó la fermentación del 10% de glucosa en 48 h para producir más de 1 mol de lactato/L de caldo de fermentación, el doble que el proporcionado previamente para las cepas basadas en K-12 de *E. coli*. Las fermentaciones con SZ63 y 10% de glucosa se estancaron después de 72 h y se produjeron sólo 840 mmoles de lactato/L de caldo después de 120 h. En medios ricos, los rendimientos de lactato fueron más altos para SZ132 (95%) que para la cepa K-12 SZ63 (88%). La productividad máxima volumétrica para SZ132 fue de 75 mmoles/l h, 76% más alta que para SZ63 (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de fermentaciones de ácido láctico

Cepas de <i>E. coli</i>	Substrato	Ácido láctico producido			Co-productos producidos (mM)		
		Concentración (mM)	Concentración ajustada a la base (mM)	Rendimiento (%)	Succinato	Acetato	Etanol
SZ132	NBS 10% Glu	556,01 ± 0,54	614,09 ± 0,54	91	32,11 ± 1,49	13,95 ± 0,57	≤ 1
SZ132	NBS 10% Glu + Betaína	792,23 ± 8,67	930,30 ± 8,67	86	78,92 ± 2,45	11,56 ± 0,75	≤ 1
SZ132	NBS 10% Sac	556,88 ± 33,21	609,78 ± 33,21	92	2,79 ± 0,02	≤ 1	≤ 1
SZ132	NBS 10% Sac + Betaína	889,06 ± 157,53	1045,95 ± 157,53	88	38,00 ± 7,33	12,24 ± 3,72	≤ 1
SZ186	NBS 10% Glu	600,41 ± 2,67	670,31 ± 2,94	99	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ186	NBS 10% Glu + Betaína	658,75 ± 21,37	744,39 ± 24,15	98	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ186	NBS 10% Sac	573,27 ± 21,98	635,76 ± 24,38	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1

SZ186	NBS 10% Glu + Betaína	638,41 ±33,59	718,06 ± 38,19	96	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194 (Nº depósito: NRRL B-30863)	NBS 10% Glu + Betaína	717,60 + 51,51	823,85 + 65,48	96	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	LB pH 6,5 10% Glu + Betaína	607,52 + 6,17	676,77 + 6,87	92	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	LB pH 7,0 10% Glu + Betaína	714,06 + 7,38	813,35 + 9,61	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	LB pH 7,5 10%Glu + Betaína	913,16 + 25,73	1070,19 + 27,57	97	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	LB pH 8,0 10% Glu + Betaína	903,22 + 21,51	1060,38 + 25,26	96	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	NBS pH 7,5 10% Gu + Betaína	864,31 + 4,93	1019,89 + 5,81	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	NBS pH 7,5 12% Glu + Betaína	1012,18 + 27,41	1227,60 + 31,16	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	NBS pH 7,5 14% Glu + Betaína	1001,08 + 9,48	1217,02 + 13,51	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	NBS pH 7,5 6+3+3% Glu + Betaína	1003,65 + 12,74	1216,45 + 16,48	93	≤ 1	≤ 1	≤ 1

5 [0056] En el medio de sales minerales NBS que contiene 5% de glucosa, el rendimiento celular y la productividad volumétrica para SZ132 fueron el doble que los de SZ63 (véase la figura 1B). La cepa SZ132 completó la fermentación del 5% de glucosa en 36 h, menos de 1/4 del tiempo requerido por SZ63. Bajo estas condiciones, el rendimiento celular y la productividad volumétrica para fermentaciones con el medio de sales minerales NBS fueron sólo del 25-35% de aquellos con el medio rico y 10% de glucosa.

10 [0057] Ni la cepa SZ132 ni la SZ63 completaron la fermentación del 10% de glucosa en el medio de sales minerales NBS dentro de 144 h (véase la figura 1C). Los rendimientos de lactato para ambas cepas fueron superiores al 90% basados en azúcar metabolizado. Con el medio de sales minerales NBS que contiene 10% de glucosa, el rendimiento celular (0,83 g/l), la producción de lactato (700 mmoles/l de caldo de fermentación) y la productividad volumétrica (11,2 mmoles lactato/l h) para SZ132 fueron de aproximadamente dos veces más altos que para SZ63. Con el medio de sales minerales NBS y 10% de glucosa, la productividad volumétrica para SZ132 fue menos del 20% de la observada en el medio rico.

15 [0058] La sacarosa se fermentó más lentamente que la glucosa en el medio rico y en el medio de sales minerales NBS. Estudios precedentes han mostrado que SZ63 (pLO13501) requirió 36 h para completar la fermentación del 5% de sacarosa en el medio rico pero que fue incapaz de completar la fermentación del 10% de sacarosa en este medio. SZ132 completó la fermentación del 10% de sacarosa en el medio rico en 120 h y produjo más de 1 mol de lactato/l de caldo de fermentación (véase la figura 1D), casi dos veces más que el proporcionado previamente por SZ63 conteniendo el plásmido de sacarosa.

20 [0059] La productividad volumétrica para SZ132 en el medio de sales minerales NBS que contiene 10% de sacarosa (9,3 mmoles/l h) fue 1/3 de la observada en el medio rico con sacarosa, menos de 1/8 de la observada en el medio rico conteniendo 10% de glucosa (Tabla 2). Aunque el 5% de sacarosa se fermentó hasta el final en el medio de sales minerales NBS en 72 h (véase la figura 1E), el 10% de sacarosa no se metabolizó completamente en este medio incluso

con tiempos de incubación extendidos. Basado en azúcar metabolizada, los rendimientos para sacarosa oscilaron de 86% a 93% en ambos medios.

[0060] Estos resultados demuestran que se pueden producir altos niveles de ácidos orgánicos a partir de glucosa y/o sacarosa por cepas modificadas de *E. coli* B. La productividad volumétrica máxima se estimó en 75 mmoles lactato/l h en el medio rico (LB), más de 3 veces superior a la del medio de sales minerales NBS. Quedan muchas oportunidades de mejora. Los tiempos de incubación requeridos para completar el metabolismo del 10% de sacarosa fueron 3 veces más largos que para el 10% glucosa en el medio complejo, más largos aún en el medio de sales minerales. Puede ser esencial reducir los tiempos de fermentación sin la costosa adición de nutrientes complejos. La identificación de los constituyentes que aumentan el crecimiento y la productividad podría reducir sustancialmente los costes asociados a la fermentación y ofrecer también una oportunidad para reducir los gastos asociados a la purificación de lactato y el tratamiento de desechos.

[0061] Las figuras 2-5 ilustran el progreso de la producción de ácido láctico (isómero D) mediante varias formas de realización, a saber SZ132; SZ186 y SZ194 (nº de depósito: NRRL B-30863) de la invención bajo varias condiciones de fermentación en el medio de sales minerales NBS.

Ejemplo 2

Preparación de la cepa SZ 194 de *E. coli*

[0062] Las cepas y los plásmidos usados en la preparación de la cepa SZ194 se recogen en la Tabla 3. Se realizaron cultivos a 37°C en el caldo de Luria modificado (por litro: 10 g de triptona Difco, 5 g extracto de levadura Difco, 5 g de cloruro sódico) (Miller, J.H. 1992 A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) o en el medio de sales minerales NBS (Causey, T.B. et al. 2004, "Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2235-2240) suplementados con 1 mM de betaína y 2% -14% (p/v) de azúcar (glucosa o sacarosa). Cuando fue necesario, se usó ampicilina (50 mg/L) y canamicina (50 mg/L) para construcciones de cepa.

Tabla 3. Cepas de *E. coli* y Plásmidos

Cepas	Características relevantes	Fuentes
SZ132	$\Delta(focA-Z. mobilis pdc-adhB-pflB) adhE::FRT \Delta ack::FRT \Delta frd, frdA::E. chrysanthemi celY lacY::K. oxytoca casAB$	Zhou et al. (2005)
SZ136	SZ132, seleccionada para crecimiento y fermentación rápidos en 10% de sacarosa	Este ejemplo
SZ162	SZ136, $\Delta frdBC::FRT \Delta adhE::FRT$	Este ejemplo
SZ186	SZ162, $\Delta casAB::FRT \Delta celY::FRT$	Este ejemplo
SZ186	SZ186, seleccionada para crecimiento y fermentación rápidos en 10% de glucosa	Este ejemplo
Plásmidos	Características relevantes	Fuentes
pKD46	<i>Bla</i> y β <i>exo</i> (recombinasa Red), replicón pSC101 condicional de temperatura	Datsenko y Wanner (2000)
pFT-A	<i>Bla flp</i> replicón pSC101 condicional de temperatura	Posfai et al. (1997)
pLOI2511	<i>colE1</i> , FRT-kan-FRT, <i>bla</i>	
pLOI3924	<i>colE1</i> , <i>bla kan lacY'-FRT-Kan-FRT-lacYA</i>	

[0063] Se usaron métodos estándar para amplificación de ADN, digestión enzimática, purificación y construcción plásmida (Miller et al., 1992; Sambrook y Russell, 2001). Los métodos para la delección del gen cromosómico y la integración se han descrito previamente (Causey et al., 2004; Datsenko and Wanner, 2000; Martinez-Morales et al., 1999; Zhou et al., 2003a).

[0064] El plásmido pLOI3924 se construyó para facilitar la delección de los genes *casAB* por clonación de los genes *lacY* y *lacA* usando ORFmers (Sigma-Genosis, The Woodlands, TX) e inserción del casete FRT-kan-FRT (digestión de SmaI) a partir de pLOI2511 entre el sitio N del carboxitérmino de *lacY* y el N-terminal ATG de *lacA*. El fragmento amplificado (ORFmer sentido para *lacY*; ORFmer antisentido para *lacA*) de este plásmido se usó para la integración cromosómica, eliminando los genes *casAB*. Los cebadores híbridos que se usaron para delecciones de gen adicionales y que contenían la secuencia correspondiente a aproximadamente 45 pares de bases del principio o del final del gen objetivo más 20

pares de bases de la secuencia de ADN correspondiente al casete de canamicina flanqueada por FRT se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Cebadores		
Cebador	SEQ ID n°:	Secuencia
cebador de sentido para delección de <i>frdBC</i>	1	ATGGCTGAGATGAAAAACCTGAAAAT TGAGGTGGTGCGCTATAACGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
cebador de antisentido para delección de <i>frdBC</i>	2	TTACCAGTACAGGGCAACAAACAGGA TTACGATGGTGGCAACCACCATATGAA TATCCTCCTTAG
cebador de sentido para delección de <i>adhE</i>	3	ATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACTT AACGCACTCGTAGAGCGTGTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
cebador de antisentido para delección de <i>adhE</i>	4	TTAAGCGGATTTTTTCGCTTTTTTCICA GCTTTAGCCGGAGCAGCCATATGAATA TCCTCCTTAG
cebador de sentido para delección de <i>celY</i>	5	GATAAGGCGGAAGCAGCCAATAAGAA GGAGAAGGCGAATGGCTGAGTGTAGG CTGGAGCTGCTTC
cebador de antisentido para delección de <i>celY</i>	6	CCAGAATACCGGTTTCGTCAGAACGCTT TGGATTGTGGATTAAATCATCATATGAAT ATCCTCCTTAG

5 [0065] A menos que se especifique lo contrario, el medio de sales minerales NBS (Causey *et al.*, 2004) que contiene 1 mM de betaína y 10% de azúcar (glucosa o sacarosa) se usó en todas las fermentaciones (pH 7,0). Los cultivos de siembra se prepararon tal y como se ha descrito previamente (Zhou *et al.*, 2003) y se usaron para inocular recipientes de fermentación de 500 ml (350 ml de volumen de trabajo, 35°C, 150 r.p.m. de agitación) a una densidad inicial de 33 mg cdw l⁻¹. Donde está indicado, también se agregó betaína (1 mM). El pH del caldo se mantuvo agregando automáticamente 6 N de KOH. Se usó un total de 12% (p/v) de glucosa en las fermentaciones de flujo continuo (6% + 3% + 3%) de la siguiente manera: 308 ml de medio NBS conteniendo 21 gramos de glucosa. Después de 24 h y 48 h, se fue añadiendo poco a poco 21 ml de 50% de glucosa en cada vaso.

15 [0066] Las células de las fermentaciones controladas por pH se transfirieron en serie en varios tiempos (24 o 48 h) para facilitar la evolución metabólica a través de la selección basada en el crecimiento. Los cultivos secuencialmente transferidos se inocularon a una densidad inicial de 33 mg cdw l⁻¹. A los clones aislados al final de las selecciones se les asignaron nuevas designaciones de cepa.

20 [0067] La masa celular se estimó por densidad óptica de medición a 550 nm usando un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 70. La producción de ácido orgánico total (principalmente lactato) se estimó por consumo de base (KOH) para mantenimiento de pH. Los productos ácidos y la pureza quiral se analizaron al final de la fermentación por cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (Zhou *et al.*, 2003a). Los datos trazados representan un promedio de 2 o más réplicas. Las barras que denotan la desviación típica se incluyen para promedios de 3 o más fermentaciones.

25 **Análisis de la producción de ácido láctico**

30 [0068] La betaína, un osmolite protector, fue altamente beneficiosa para el crecimiento celular y la producción de lactato por SZ132 en el medio de sales minerales que contenía altas concentraciones de azúcar, supuestamente debido a la insuficiente división de carbono en la biosíntesis de osmolites nativos tales como glutamato y trehalosa (Purvis *et al.*, 2005). Las transferencias en serie de SZ132 se llevaron a cabo en el medio de sales minerales conteniendo 10% de sacarosa para seleccionar las cepas con rendimiento equivalente en ausencia de betaína. La producción de energía para el crecimiento en la cepa SZ132 depende del flujo glicolítico con lactato como ruta dominante para la oxidación NADH, proporcionando una selección basada en el crecimiento. El crecimiento y la producción de ácido (consumo de base) mejoró firmemente durante las transferencias en serie. En las transferencias finales, el 10% de sacarosa se fermentó hasta el final sin betaína añadida. Se aisló un clon de este cultivo y se denominó cepa SZ136. Esta cepa produjo el doble de rendimiento celular que la progenitora, SZ132, y títulos 3 veces más altos de lactato después de 96 h. No obstante, SZ136 también produjo niveles más altos de succinato y de etanol que SZ132 (Tabla 5), reduciendo el rendimiento de lactato (basado en azúcar metabolizado).

Tabla 5. Productos de fermentaciones de glucosa

Cepa	Condiciones ^a	Lactato		Coproducidos (mmol l ⁻¹)		
		mmol l ⁻¹	Rendimiento (%) ^b	Succinato	Acetato	Etanol
SZ132	NBS + betaína	930 ± 9	86	79 ± 2	12 ± 1	< 1
SZ136	NBS	739	67	126	8	115
SZ162	NBS	660 ± 27	96	< 1	< 1	< 1
SZ186	NBS	670 ± 3	99	< 1	< 1	< 1
SZ186	NBS + betaína	744 ± 24	98	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS + betaína	824 ± 65	96	< 1	< 1	< 1
SZ194	Caldo de Luria pH 6,5	677 ± 7	92	< 1	< 1	1
SZ194	Caldo de Luria pH 7,0	813 ± 10	95	< 1	< 1	< 1
SZ194	Caldo de Luria pH 7,5	1070 ± 28	97	< 1	< 1	< 1
SZ194	Caldo de Luria pH 8,0	1060 ± 25	96	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS, pH 7,5 + betaína	1020 ± 6	95	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS pH7,5 12% glucosa + betaína	1228 ± 31	95	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS, pH 7,5 14% glucosa + betaína	1217 ± 14	95	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS, pH7,5 glucosa (6+3+3%) + betaína	1216 ± 17	93	< 1	< 1	< 1

^a Medio de sales minerales NBS que contiene 10% de glucosa (pH 7,0) a menos que se especifique lo contrario. Donde se indique, también se añadió 1 mM de betaína.

^b Los rendimientos están basados en azúcar metabolizada asumiendo un rendimiento teórico máximo de 2 moles de lactato por mol de hexosa (igual conversión de peso).

[0069] Las mejoras en el crecimiento en SZ132 en 10% (p/v) de sacarosa parecen haber estado acompañadas de mutaciones que mejoraron el crecimiento pero que también restauraron parcialmente la función de los genes mutados para vías de co-producto. La mutación de fumarato reductasa en la cepa SZ132 está mal caracterizada y se obtuvo originalmente como una delección Tn5 (Ohta *et al.*, 1991), seguida de inserción de celY entre frdA y frdB (Zhou *et al.*, 2005). El gen de alcohol deshidrogenasa fue interrumpido por inserción de un marcador antibiótico con sitios FRT flanqueantes. Después se usó flipasa para eliminar el gen antibiótico sólo dejando una región FRT. La delección adicional de las regiones codificantes para adhE y frdBC para producir SZ162 eliminó ambos co-productos pero también redujo el crecimiento y el título de lactato final debido a la utilización de azúcar incompleto (Tabla 5). También se hicieron delecciones adicionales en esta cepa para eliminar genes foráneos que se habían integrado previamente para la utilización de celulosa (Zhou *et al.*, 2005): casAB (gen transportador de celobiosa) de *Klebsiella oxytoca* y celY (endoglucanasa) de *Erwinia chrysanthemi*. La cepa resultante, SZ186, produjo niveles insignificantes de co-productos pero fue incapaz de utilizar completamente el 10% de azúcar en el medio de sales minerales con o sin betaína (Tabla 5). No obstante, las producciones basadas en azúcar metabolizado fueron altas (96%-99%) para ambas SZ162 y SZ186.

[0070] Las delecciones en SZ136 que eliminaron las vías de co-producto (SZ186) también redujeron el rendimiento celular casi a la mitad, afectando negativamente a la división de carbono en la biosíntesis. La evolución metabólica se usó para coseleccionar un derivado de SZ186 con crecimiento y rendimiento de fermentación mejorados en presencia de 1 mM de betaína y 10% de glucosa. El rendimiento celular y la producción de ácido orgánico aumentó al mismo tiempo durante las etapas de selección iniciales. Un único clon fue aislado del último enriquecimiento y se denominó SZ194 (NRRL B-30863).

[0071] La cepa SZ194 creció más rápidamente que la SZ186 y alcanzó un rendimiento celular más alto. Concentraciones de lactato de hasta 900 mM fueron producidas por SZ194 en algunas fermentaciones, consistentemente más altas que las de SZ186 (Tabla 5). Ambas cepas produjeron lactato a partir de glucosa a casi rendimientos teóricos con co-productos mínimos. Con ambas cepas, no obstante, el azúcar quedó sin usar a pH 7,0 incluso después de prolongar la incubación. A pH 7,0, los 800-900 mM de lactato producido a partir del 10% (p/v) de glucosa está bien por encima de la concentración máxima de lactato necesaria para inhibir el crecimiento a pH 7,0 y también puede inhibir el metabolismo de la glucosa adicional.

[0072] Se exploraron dos factores como posible causa de la fermentación incompleta del 10% (p/v) de azúcar por SZ194: un defecto nutricional desconocido y la tolerancia al lactato. El reemplazo del medio de sales minerales conteniendo 1 mM de betaína con caldo de Luria (medio rico) a pH 7,0 tuvo poco efecto en el rendimiento de lactato (Tabla 5) o la producción de lactato (Tabla 6). Se evaluó la toxicidad del lactato comparando el efecto de pH en la fermentación (Tabla 5). La toxicidad de los ácidos débiles orgánicos tales como el lactato está relacionada, en parte, con la acción de desacoplamiento de la forma neutra conjugada (Warnecke *et al.*, 2005), que a su vez es inversamente proporcional al pH. Una tendencia similar fue observada para la fermentación. En el caldo de Luria, los títulos de lactato final fueron mínimos a pH 6,5 y máximos a pH 7,5 y pH 8,0. Los cambios en el pH tuvieron menos efecto en el rendimiento celular. A pH 7,5, se fermentó el 10% (p/v) de glucosa hasta el final durante 72 h usando caldo de Luria.

Tabla 6. Comparación de productividad de lactato

Cepa	Condiciones de fermentación ^a	Título de lactato (mmol l ⁻¹)	Rendimiento celular (g l ⁻¹)	Productividad volumétrica ^b (mmol l ⁻¹ h ⁻¹)	Productividad específica ^b (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Productividad volumétrica ^b (g l ⁻¹ h ⁻¹)
SZ132	pH 7,0	930	2,07	24,6	11,9	2,21
SZ194	pH 7,0	824	1,73	18,5	10,7	1,67
SZ194	pH 7,5	1020	1,67	23,8	14,2	2,14
SZ194	Caldo de Luria, pH 7,5 sin adición de betaína	1070	1,75	24,7	14,1	2,22

^a Sales minerales (NBS) que contienen 10% (p/v) de glucosa y 1 mM de betaína a menos que se especifique lo contrario.

^b Valores medios para el período de 24 h más productivo.

[0073] El beneficio de este aumento en el pH fue confirmado en el medio de sales minerales con 1 mM de betaína (Tabla 5). A pH 7,5, se fermentaron 10% y 12% (p/v) de glucosa hasta el final, produciendo más de 1 mol de lactato l⁻¹ con sólo cantidades de rastro de co-productos (Figura 3A). Los rendimientos de producto de 0,95 g de lactato por g de glucosa representan el 95% del rendimiento teórico máximo basado en el azúcar total añadido a la fermentación. La adición de niveles más altos de azúcar no aumentó más los títulos de lactato finales. Se observaron títulos finales similares durante experimentos por lote alimentado y no aumentaron más cuando se añadió azúcar adicional. Los títulos de lactato finales de aproximadamente 1,0-1,2 M parecen representar un límite superior para la metabolización de azúcar a pH 7,5 por SZ 194 (Tabla 5).

[0074] Es interesante destacar que el pH 7,5, el pH óptimo para la fermentación, están muy cerca del proporcionado para el citoplasma de *E. coli* (Axe *et al.*, 1995; Warnecke *et al.*, 2005). Aunque no se han identificado genes transportadores de lactato en el *E. coli*, varios estudios han proporcionado evidencia de su presencia en *E. coli* y en bacterias de ácido láctico (Axe *et al.*, 1995; Konings, 2002; Poolman, 2002). Se cree que estos transportadores son los importadores lactato/H⁺, actividades que pueden aumentar en eficiencia con aumentos en el pH externo. Según al "modelo de reciclado de energía" (Michels *et al.*, 1979), el flujo de salida mediado por portador de productos finales metabólicos tal como lactato puede llevar a la generación de un gradiente de protón electroquímico a través de la membrana y contribuir a la producción de ATP. El flujo de salida de lactato en bacterias de ácido láctico se estima que aporta el 30% de la energía celular total (van Maris *et al.*, 2004). Dado que la SZ194 de *E. coli* y las bacterias de ácido láctico metabolizan glucosa por vías similares, es posible que el ATP adicional también se produzca por flujo de salida de lactato en el *E. coli*.

[0075] Se examinó la pureza quiral del lactato producido por SZ194 y se descubrió que es superior al 95% de D-lactato. Aunque es buena, esta pureza quiral es inferior a la de la cepa progenitora, SZ132 (99,5% de D-lactato) (Zhou *et al.*, 2005). La fuente de esta impureza quiral se desconoce.

[0076] Según la presente invención, se pueden producir títulos de lactato por encima de 1 M mediante SZ194 de *E. coli* a pH 7,5 en el medio de sales minerales suplementado con 1 mM de betaína. En este medio, la productividad de lactato y el rendimiento celular para SZ194 fueron equivalentes a los del caldo de Luria (Tabla 6). El título de lactato final de 110 g l⁻¹ y el rendimiento (0,95 g de lactato g de glucosa⁻¹) para la cepa SZ194 se comparan favorablemente con bacterias de ácido láctico tales como *L. helveticus* (Kyla-Nikkila *et al.*, 2000) y *L. delbrueckii* (Demirci *et al.*, 1992) y exceden el rendimiento de biocatalizadores creados genéticamente previamente en el medio rico o en sales minerales (Dien *et al.*, 2001; Porro *et al.*, 1999; Saitoh *et al.*, 2005; van Maris *et al.*, 2004b).

Ejemplo 3

Materiales y métodos

5 Cepas, plásmidos, medios y condiciones de crecimiento

[0077] Las cepas de *E. coli*, los plásmidos y los cebadores utilizados en este estudio aparecen en la Tabla 7. La cepa SZ194 se construyó previamente a partir de un derivado de *E. coli* B (ATCC 11303) y sirvió como punto de partida para las construcciones (véase Ejemplo 2 y Zhou *et al.*, 2006). Durante las construcciones de cepas, se realizaron cultivos de manera aeróbica a 30°C, 37°C o 39°C en el caldo de Luria (por litro: 10 g de triptona Difco, 5 g de extracto de levadura Difco y 5 g de cloruro sódico) (Miller 1992) con 2% (p/v) de glucosa o arabinosa. Se añadió ampicilina (50 mg/L), tetraciclina (12,5 o 6,25 mg/L) o canamicina (25 o 50 mg/L) según se fue necesitando. Para pruebas de fermentación, se cultivaron cepas sin antibióticos a 37°C en el medio de sales minerales NBS (Causey *et al.*, 2004) suplementado con 1 mM de betaína y 2-12% (p/v) de glucosa. Se agregó tampón MOPS (100 mM, pH 7,4) al medio sólido y líquido bajo condiciones sin control de pH (placas, tubos, matraces agitados).

Métodos genéticos

[0078] Se siguieron los protocolos del fabricante y los métodos estándar (Miller 1992, Sambrook y Russell 2001) para purificación de ADN (Qiagen), digestión de endonucleasa de restricción (New England Biolabs), amplificación de ADN (Stratagene e Invitrogen) y transformación. Los métodos para delecciones cromosómicas e integración se han descrito previamente (Causey *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2003, Datsenko y Wanner 2000, Martínez-Morales *et al.*, 1999). Se usaron los cebadores híbridos (Tabla 7) que contienen secuencias homólogas de los 50 nucleótidos del principio o del final del gen *mgsA* (cursiva) más 20 nucleótidos correspondientes a la secuencia del casete de canamicina flanqueado por FRT (subrayado) de pKD4 para eliminar el gen nativo *mgsA*. El plásmido pLOI2398 se construyó previamente para facilitar la integración del *ldhL* de *Pediococcus acidilactici* en el gen *ldhA* cromosómico de *E. coli* (Zhou *et al.*, 2003a).

Fermentaciones

[0079] Se cultivó el preinóculo mediante la inoculación de una colonia en un matraz de 250-ml (100 ml de medio NBS con 2% (p/v) de glucosa y 100 mM de MOPS, pH 7,4). Después de 16 h (37°C, 120 r.p.m.), este preinóculo se diluyó en recipientes de fermentación de 500-ml que contenían 350 ml de medios NBS (5-12% de azúcar, con o sin 1 mM de betaína) para proporcionar 33 mg dcw l⁻¹. Después de 24-h (37°C, 150 r.p.m., pH controlado a 7,0), este cultivo se usó para proporcionar un inóculo de inicio de 33 mg dcw l⁻¹. Se proporciona la productividad volumétrica del periodo de 24 h más activo. La productividad específica se calculó como el cociente de productividad volumétrica dividido por la masa celular en 24 h.

Evolución metabólica

[0080] Las células de las fermentaciones controladas por pH se fueron transfiriendo en serie a intervalos de 24 o 48 h para facilitar la evolución metabólica aunque competitiva, basada en el crecimiento. En cada transferencia, se diluyeron los inóculos (1/100 a 1/350) en medios frescos precalentados. A los clones aislados de estas selecciones se les asignaron nuevas designaciones de cepa.

45 Análisis

[0081] La masa celular se estimó midiendo la densidad óptica a 550 nm usando un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 70. La producción de ácido orgánico total, principalmente lactato, se estimó por consumo de KOH usado para mantener el pH 7,0. Los productos ácidos y la pureza quiral se analizaron al final de la fermentación por cromatografía en fase líquida de alta eficacia. Las estimaciones de ácido orgánico por consumo de base fueron sistemáticamente inferiores a las mediciones de lactato por HPLC, supuestamente debido al metabolismo mineral.

Resultados y discusión

55 Restauración de la pureza quiral para la producción de D-(-)-lactato

[0082] Se ha demostrado que la cepa SZ194 produce eficazmente D-(-)-lactato a partir de glucosa con una pureza quiral del 99% en el medio de sales minerales (Zhou *et al.*, 2006). La betaína aumentó la productividad de lactato (título e índice) con altas concentraciones de azúcar pero también disminuyó la pureza quiral al 95% (Tabla 8). Hay diferentes fuentes posibles de L-(+)-lactato en *E. coli*. El L-(+)-lactato se puede producir a partir de lactaldehído, un intermedio en el catabolismo de ramnosa o fucosa (Badia *et al.*, 1991), ambas ausentes en nuestros medios, y como un producto del baipás de metilglioxal de glucólisis. El baipás metilglioxal representa una ruta de derrame corta que se induce por acumulación de dihidroxiacetona-fosfato durante la glucólisis rápida, y por una limitación de fosfato para síntesis de ATP. La acumulación de dihidroxiacetona-fosfato y la limitación de fosfato podría ser exacerbada por índices altos de flujo glicolítico. Para probar esta hipótesis, el gen *mgsA* que codifica el primer paso implicado, metilglioxal sintasa, fue eliminado. La cepa resultante, TG112 (NRRL B-30926), produjo D-(-)-lactato quiralmente puro (Tablas 8 y 9). El

crecimiento y la productividad inicial aumentaron por esta delección en comparación con SZ194. Los rendimientos basados en los análisis HPLC fueron similares (Tabla 8).

[0083] Otras mejoras fueron seleccionadas en la TG112 por evolución metabólica durante 81 días de cultivo. Los cultivos fermentando se transfirieron en serie al medio de sales minerales que contenía 10% (p/v) de glucosa, 12% (p/v) de glucosa y 12% (p/v) de glucosa con 1 mM de betaína. Se aisló un clon el día 28 (TG 113 NRRL B-30927) y otro al final del enriquecimiento (TG114 NRRL B-30928). La productividad de **D**-(-)-lactato (índice, título y rendimiento) y el rendimiento celular mejoraron durante este proceso (Tabla 8 y Tabla 9). La fermentación con SZ114 se completó sustancialmente en 48 h en la mayoría de los experimentos, con un rendimiento final de 0,98 g de **D**-(-)-lactato g⁻¹ de glucosa. Los inóculos altos proporcionaron una modesta mejora adicional en las productividades volumétricas y específicas. Los co-productos y las impurezas quirales estaban por debajo del nivel de detección (<0,1%) con estas cepas sin mgsA. La producción de **D**-(-)-lactato por TG 114 se compara favorablemente con otros biocatalizadores y ofrece alta productividad, título, rendimiento y pureza quiral con medios simples y condiciones de fermentación (Tabla 10).

Producción de **L**-(+)-lactato quiralmente puro

[0084] La cepa de **D**-(-)-lactato, SZ194, se recreó genéticamente para producir principalmente **L**-(+)-lactato por sustitución del gen nativo *ldhA* que codifica una deshidrogenasa de **D**-(-)-lactato con el gen *ldhL* de *P. acidilactici* que codifica la deshidrogenasa de **L**-(+)-lactato (Zhou *et al.*, 2003a). La cepa resultante, TG102, produjo principalmente **L**-(+)-lactato y se transfirió en serie al medio mínimo conteniendo 5% (p/v) de glucosa, 10% (p/v) de glucosa y 10% (p/v) de glucosa con 1 mM de betaína para seleccionar crecimiento y productividad mejorados. Después de 24 días, se seleccionó un clon y se denominó TG103. Aunque la productividad de lactato mejoró debido a un aumento en el flujo glicolítico (Tabla 9), el **L**-(+)-lactato fue contaminado con 5% **D**-(-)-lactato (Tabla 8). Ya que el baipás de metilglicoxal tiene el potencial de producir ambas formas quirales de lactato, mgsA fue identificado como la fuente más probable de impureza quiral. Se restauró la pureza quiral absoluta después de eliminar el mgsA. La cepa resultante, TG105 (NRRL B-30922), sólo produjo **L**-(+)-lactato (Tabla 8). Hubo más mejoras mediante cultivo y productividad de coselección durante las transferencias en serie al medio de sales minerales conteniendo 10%-12% (p/v) de glucosa y 1 mM de betaína (dilución de inóculo de 1:100 a 1:350). TG106 (NRRL B-30923) y TG107 (NRRL B-30924) fueron aisladas como cepas intermedias después de 10 y 22 transferencias, respectivamente. La cepa TG108 (NRRL B-30925) fue aislada después de 99 días. Todas produjeron sólo **L**-(+)-lactato a altos rendimientos con niveles mínimos de co-productos (Tabla 8). Las productividades volumétricas en 12% (p/v) de glucosa y el rendimiento celular aumentaron durante la selección de la cepa aunque la productividad específica permaneció esencialmente constante (Tabla 9). Se observaron pequeños aumentos en la productividad volumétrica máxima (periodo de 24-h más activo) con inóculos más altos.

[0085] Se comparó la cepa TG108 con otros biocatalizadores para la producción de **L**-(+)-lactato (Tabla 10). El título y el rendimiento para esta cepa fueron más altos que los de los proporcionados para otros organismos. Otras ventajas incluyen condiciones y medios de fermentación simple y pureza quiral.

Conclusiones

[0086] Los títulos altos (>100 g l⁻¹ en 48 h) de **L**-(+) y **D**-(-)-lactato quiralmente puros (> 99,9% pureza quiral) se pueden producir fácilmente por *E. coli* B recombinante en el medio de sales minerales suplementado con 1 mM de betaína. La delección del baipás metilglicoxal fue esencial para eliminar las impurezas en los enantiómeros **D**-(+) y **L**-(-) de lactato.

Ejemplo 4

Construcción de TG128 por delección de todos los ADN foráneos de TG114

[0087] Para facilitar la aplicación comercial de las cepas de *E. coli* recombinantes para la producción de lactato, se construyó otro derivado de TG114 en el que todos los ADN extraños que se habían dejado atrás en el cromosoma durante la ingeniería genética precedente se eliminaron. Los ADN eliminados incluían regiones de cicatriz que contenían el sitio de reconocimiento de FRT para la flipasa (recombinasa) usado para eliminar los marcadores antibióticos, pequeños fragmentos de ADN de *Zymomonas mobilis*, parte del *casAB* de *Klebsiella oxytoca* y parte del *celY* de *Erwinia chrysanthemi*. Estos segmentos de ADN foráneo se eliminaron completamente dejando sólo el ADN cromosómico nativo en el que las regiones centrales de los genes seleccionados se han eliminado para mejorar la producción de lactato.

Cepas, plásmidos, medios y condiciones de crecimiento

[0088] Las cepas de *E. coli*, los plásmidos y los cebadores usados en este estudio se encuentran en la Tabla 11. La cepa TG114 se construyó anteriormente a partir de un derivado de *E. coli* B (ATCC 11303) y sirvió como punto de partida para las construcciones (Grabar *et al.*, 2006). Durante las construcciones de cepas, se realizaron cultivos de forma aeróbica a 30°C, 37°C o 39°C en el caldo de Luria (por litro: 10 g de triptona Difco, 5 g de extracto de levadura Difco y 5 g de cloruro sódico) (Miller 1992) conteniendo 2% (p/v) de glucosa o arabinosa o 10% de sacarosa. Se añadió ampicilina (50 mg/L), clorotetraciclina (10 mg/L) o cloranfenicol (40 mg/L) según fue necesario.

[0089] Los cultivos se mantuvieron en placas conteniendo el medio de sales minerales NBS (Causey *et al.*, 2004) suplementado con 2% (p/v) de glucosa. Se añadió un tampón MOPS (100 mM, pH 7,4) al medio sólido y líquido bajo condiciones sin control de pH (placas, tubos, matraces agitados). Para pruebas de fermentación, se cultivaron cepas sin antibióticos a 37°C en el medio de sales minerales AM1 (por litro: 2,63 g de (NH₄)₂HPO₄, 0,87 g de NH₄H₂PO₄, 0,37 g de MgSO₄ · 7H₂O, 2,4 mg de FeCl₃, 0,3 mg de CoCl₂ · 6H₂O, 0,15 mg de CuCl₂, 0,3 mg de ZnCl₂ · 4H₂O, 0,3 mg de NaMoO₄, 0,075 mg de H₃BO₃, 0,075 mg de MnCl₂ · 4H₂O, 1 mM de betaína y 120 g/L de glucosa).

Métodos genéticos

[0090] Se siguieron los protocolos del fabricante y los métodos estándar (Miller 1992, Sambrook y Russell 2001) para clonar genes (Invitrogen), purificación de ADN (Qiagen), digestión de endonucleasa de restricción (New England Biolabs), amplificación de DNA (Stratagene e Invitrogen) y transformación. Los métodos para delecciones cromosómicas e integración se han descrito previamente (Causey *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2003, Datsenko y Wanner 2000, Martinez-Morales *et al.*, 1999). Una descripción de los plásmidos y los cebadores usados se encuentra en la Tabla 11.

Construcciones plásmidas

[0091] El plásmido pLO1441 se generó mediante cebadores de diseño que se amplificaron dentro del operón *frdABCD* de gDNA de *E. coli* B, 'frdA frdB frdC y frdD', y ligamiento posterior en el vector de clonación de Invitrogen, pCR2.1-TOPO (Tabla 11). Los plásmidos pLO14412, pLO14413, pLO14415 y pLO14416 fueron construidos mediante un método similar para clonar los genes nativos de interés, *ackA*, *adhE*, *focA-plfB* y *mgsA*, respectivamente.

[0092] Los plásmidos que codifican las inactivaciones del gen continuo se generaron usando cebadores de antisentido. Los cebadores de antisentido con grupos de fosfato 5' se diseñaron para amplificar el plásmido entero menos la región del gen que se va a omitir. Por ejemplo, pLO14417 se generó mediante la realización de una PCR en pLO14411 1 con un cebador que anillaba el final 3' de *offrdA*, extendiéndose aguas arriba, y un cebador que anillaba dentro de *frdC*, extendiéndose aguas abajo. El producto PCR resultante de 4.263 pares de bases se trató con enzima de restricción DpnI para asimilar el plásmido nativo pLO14411. Los productos de PCR digeridos se autoligaron posteriormente para generar el nuevo plásmido, pLO14417. Los plásmidos pLO14418, pLO14419, pLO14421 y pLO14422 se generaron de forma similar usando los grupos de cebadores de la Tabla 11. Estos plásmidos sirvieron como un molde de PCR para amplificar el ADN lineal que contenía la delección deseada y fueron desprovistos de toda secuencia heteróloga. Este ADN lineal se usó para reemplazar regiones de cicatriz FRT, ADN heterólogo y *sacB* por recombinación homóloga (evento de doble cruce). De esta manera, se hicieron delecciones continuas de genes seleccionados en el cromosoma.

Delección de cicatriz FRT y ADN heterólogo de TG114

[0093] Las cicatrices objetivo de reconocimiento de FLP (FRT) de ~85 pares de bases dejadas atrás por el método de delección de un único paso de Datsenko y Wanner (2000) se eliminaron mediante un método de dos pasos. Primero, los sitios FRT fueron individualmente elegidos por un casete circular FRT-cat-*sacB* que dio como resultado una única integración de cruce de este casete en una cicatriz FRT del cromosoma (FRT-cat-*sacB*-FRT). El ADN circular que contiene el casete cat-*sacB*-FRT se construyó de la siguiente manera: 1) Amplificación por PCR del casete FRT-cat-*sacB* usando el plásmido pLO14151 como molde. El casete amplificado incluyó los sitios PstI flanqueantes; 2) Digestión con PstI seguida de autoligamiento para producir círculos cerrados incapaces de replicación autónoma. Este ADN circular se usó para la integración. La expresión del gen cat confirió resistencia al cloranfenicol y permitió la selección directa de células conteniendo la integración.

[0094] En el segundo paso, el gen *sacB* permitió una selección directa de células en las que la región de ADN que contiene el *sacB* se ha eliminado por recombinación homóloga (evento de doble cruce). Las células que expresan *SacB* en presencia de 10% de sacarosa (Ausubel *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2001) fueron matadas y lisadas por la producción intracelular de polisacárido. Con este método, las recombinantes en las que se había insertado ADN para reemplazar *sacB* se pudieron seleccionar de grandes poblaciones. En este ejemplo, la integración de un fragmento de ADN lineal vía un evento de cruce doble dio como resultado una cepa mutada limpia que contiene sólo ADN nativo o ADN nativo con delecciones, carente de todo ADN heterólogo. La secuencia de ADN nativa o la secuencia nativa que contiene una delección génica deseada se usó en este segundo paso para eliminar completamente las regiones de cicatriz FRT y todo el ADN heterólogo de la cepa TG 114.

[0095] Tras la electroporación con el fragmento de ADN lineal, las células se incubaron con agitación a 37°C durante 4 horas en 1 mL de medio SOC. Después de las 4 horas de cultivo, las células se incubaron durante 16-20 horas en 50 mL de LB sin sal (por litro: 10 g de triptona Difco, 5 g de extracto de levadura Difco) suplementado con 10% (p/v) de sacarosa. Luego las células fueron batidas en placas de LB agar sin sal suplementadas con 5% de sacarosa. La mayoría de las células que mantuvieron el FRT-cat-*sacB* no eran viables después de períodos prolongados en presencia de sacarosa. Las células viables que formaban colonias fueron desprovistas de *sacB* y de las regiones de cicatriz.

[0096] Este método se usó consecutivamente para eliminar las 5 cicatrices FRT presentes en TG114 y para restaurar el operón *lac*. Los cebadores, plásmidos y cepas usados en este proceso se resumen en la Tabla 11. Los genes *casAB*

integrados en el lacA también se eliminaron y sustituyeron con la secuencia de tipo salvaje en esta región usando una modificación de este método de dos pasos. Los fragmentos de celY de *Erwinia chrysanthemi* (y ADN de *Z. mobilis*) integrados en frdA se eliminaron durante la construcción de la delección de frdBC uniforme. La cepa resultante, TG128, está desprovista de cicatrices FRT y sólo contiene secuencias de ADN nativo con regiones eliminadas en los genes indicados en la Tabla 11. Se muestra una comparación de la secuencia original de la región de las delecciones de gen para TG 114 y TG128 (Tabla 12).

Restauración del operón lac nativo

[0097] TG 114 contenía segmentos de ADN heterólogo (fragmentos de ADN de *Zymomonas mobilis*, casAB de *Klebsiella oxytoca* y parte de celY de *Erwinia chrysanthemi*) de construcciones previas en la región lacY, lacA (Grabar *et al.*, 2006). Estos se eliminaron de TG120 para producir TG122 y están ausentes en derivados posteriores de TG122. Los cebadores para esta construcción se enumeran en la Tabla 11. Para realizar esto, la región nativa de lacZ' a cynX se amplificó de *E. coli* B y se clonó en pCR2.1-TOPO para producir pLOI3956. Para facilitar la selección de recombinantes, la región central de pLOI3956 (lacZ'-lacA') se sustituyó con un casete que contenía los genes cat y sacB de la siguiente manera. Con pLOI3956 como molde, se usaron cebadores de antisentido con unos sitios NheI para amplificar lacZ', pCR2.1 y cynX (omitiendo parte de lacZ', lacY, lacA y parte de cinX'). Se usó un segundo conjunto de cebadores con sitios NheI para amplificar un casete de cat-sacB a partir del plásmido pEL04 (originalmente conocido como pK04, Ausubel *et al.*, 2005 y Lee *et al.*, 2001). Después de la digestión con NheI, estos productos PCR fueron ligados para producir pLOI3957, un derivado de pCR2.1 que contiene lacZ'-sacB-cat-cynX'. Usando el plásmido pLOI3957 como molde, la región lacZ'-sacB-cat-cynX' fue amplificada por PCR e integrada en TG120 con selección para resistencia de cloranfenicol para producir TG121. Usando pLOI3956 como molde, la región de tipo salvaje lacZ'-lacY-lacA-cynX' fue amplificada por PCR e integrada en TG121. Los integrantes que contenían la secuencia nativa del operón lacZYA fueron seleccionados por la ausencia de función de sacB durante el crecimiento en presencia de sacarosa. Un de estos se denominó TG122. La cepa TG122 fue una cepa intermedia durante la construcción de TG128.

Fermentaciones

[0098] Se cultivó preinóculo mediante la inoculación de una colonia en un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de medio NBS (Causey *et al.*, 2004) con 2% (p/v) de glucosa y 100 mM de MOPS (pH 7,4). Después de 16 h (37°C, 120 r.p.m.), este preinóculo fue diluido en recipientes de fermentación de 500 ml que contenían 350 ml de medio de sales minerales AF1 (12% de azúcar) para proporcionar 33 mg dcw/L. Después de 24 h (37°C, 150 r.p.m., pH controlado a 7,0), el cultivo resultante fue usado para proporcionar inóculo de inicio de 33 mg dcw/L e incubado bajo las mismas condiciones durante 96 h. Se retiraron muestras para análisis.

Análisis

[0099] La masa celular se estimó por medición de la densidad óptica a 550 nm usando un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 70. La producción de ácido orgánico total, principalmente lactato, fue estimada por consumo de KOH usado para mantener el pH 7,0. Los productos ácidos y la pureza quiral fueron analizados al final de la fermentación por cromatografía en fase líquida de alta eficacia. Las estimaciones de ácido orgánico por consumo de base fueron consistentemente inferiores a las mediciones de lactato por HPLC, supuestamente debido al metabolismo mineral.

Fermentación de glucosa por TG128

[0100] La cepa TG114 fue sometida a manipulación genética intensiva para eliminar las cicatrices FRT y otro ADN extraño. El organismo resultante, la cepa TG128, sólo contenía secuencia de ADN de tipo salvaje nativo y delecciones uniformes de genes para eliminar los productos de fermentación indeseada. El rendimiento de fermentación de esta cepa fue esencialmente equivalente al de TG114, rendimientos de lactato de 96-98% del rendimiento máximo teórico (Tabla 13).

Selección de mutantes termotolerantes para producción de lactato por evolución metabólica

[0101] Se usó la evolución metabólica para seleccionar cepas capaces de producir lactato eficaz a temperaturas elevadas. Las células de fermentaciones controladas por pH se transfirieron en serie a intervalos de 24 h para facilitar la evolución metabólica aunque competitiva, selección basada en el crecimiento. En cada transferencia, se diluyeron inóculos (1/100 a 1/350) en medios frescos precalentados. La temperatura de incubación se aumentó por una fracción de un grado según el crecimiento permitió el aislamiento de cepas termotolerantes. La cepa TG128 fermenta óptimamente a 37°C. Se obtuvieron mutantes por el aumento progresivo de la temperatura de incubación durante transferencias sucesivas. Con este método, se seleccionaron cepas nuevas de TG128 que son ahora capaces de fermentación eficaz a 39°C (cepa TG129; NRRL B-30963) y 43°C (cepa TG130; NRRL B-30964). Los rendimientos para ambas cepas termotolerantes a temperatura elevada fueron equivalentes a los de TG 114 a 37°C (Tabla 13).

Fermentación de glucosa por TG128

[0102] La cepa TG114 fue sometida a manipulación genética intensiva para eliminar las cicatrices FRT y otro ADN extraño. El organismo resultante, la cepa TG128, sólo contiene secuencia de ADN de tipo salvaje, nativo y delecciones

uniformes de genes para eliminar productos de fermentación indeseada. El rendimiento de fermentación de esta cepa fue esencialmente equivalente al de TG 114, rendimientos de lactato de 96-98% del rendimiento máximo teórico (Tabla 13).

5 Selección de mutantes termotolerantes para producción de lactato

[0103] La evolución metabólica se usó para seleccionar cepas capaces de producción de lactato eficaz a temperaturas elevadas. Las transferencias en serie a fermentadores en los que la temperatura se aumentó por una fracción de un grado permitieron el aislamiento de TG129 que fermenta óptimamente a 39°C y TG130 que fermenta óptimamente a 43°C. Los rendimientos para ambas a temperatura elevada fueron equivalentes a los de TG114 a 37°C (Tabla 13).

10

Tabla 7. Cepas de <i>E. coli</i> , plásmidos y cebadores usados en este estudio		
Plásmido o Cepa	Características relevantes	Fuentes
Cepas		
SZ 194 (NRRL B-30863)	<i>pflB frd adhE ackA</i>	Zhou <i>et al.</i> (2006)
TG 102 (NRRL B-30921)	SZ194, $\Delta ldhA::ldhL-FRT$	Este estudio
TG 103 (NRRL B-30864)	Mutante de TG 102 con crecimiento mejorado y actividad <i>ldhL</i>	Este estudio
TG105 (NRRL B-30922)	TG 103, $\Delta mgsA::FRT$	Este estudio
TG 106 (NRRL B- 30923), TG107 (NRRL B-30924) y TG 108 (NRRL B- 30925)	Mutantes de TG 105 con crecimiento mejorado y actividad <i>ldhL</i>	Este estudio
TG112 (NRRL B-30926)	SZ194, $\Delta mgsA::FRT$	Este estudio
TG 113 (NRRL B-30927) y TG 114 (NRRL B- 30928)	Mutantes de TG 112 con crecimiento mejorado y actividad <i>ldhA</i>	Este estudio
Plásmidos		
pKD46	<i>bla $\gamma\beta$ exo</i> (recombinasa Red), replicón pSC101 condicional de temperatura	Datsenko y Wanner (2000)
pFT-A	<i>bla flp</i> replicón pSC 101 condicional de temperatura	Posfai <i>et al.</i> (1997)
pKD4	<i>bla kan</i> ; R6K ori; casete <i>FRT-kan-FRT</i>	Datsenko y Wanner (2000)
PLOI2398	<i>kan</i> ; <i>ldhA'-ldhL-FRT-tet-FRT-ldhA</i> ; R6K ori	Zhou <i>et al.</i> (2003)
Cebadores		
Cebador sentido para delección de <i>mgsA</i>	<i>Atgtacattatggaactgacgactcgactttacctgcgcgg aaacatatgtgtaggctggagctgcttc</i> (SEQ ID nº: 7)	Este estudio
Cebador antisentido para delección de <i>mgsA</i>	<i>Ttacttcagacggtccgcgagataacgctgataatcgggga tcagaatatcatatgaatatcctccttag</i> (SEQ ID nº: 8)	Este estudio

Tabla 8. Productos de fermentaciones de glucosa

Cepa	Condiciones ^a	Lactato			Co-productos (mmol l ⁻¹)		
		mmol l ⁻¹	Rendimiento (%) ^b	Pureza quiral (%)	Succinato	Acetato	Etanol
SZ194	NBS, pH 7,5 +betaína	1228 ± 31	95	95	< 1	< 1	< 1
<u>TG102</u>	NBS 5% de glucosa	555 ± 6	99	99,5	< 1	< 1	< 1
<u>TG102</u>	NBS 10% de glucosa	697 ± 13	96	99,5	< 1	< 1	< 1
<u>TG102</u>	NBS 10% de glucosa + betaína	1025 ± 18	94	95	< 1	< 1	< 1
<u>TG103</u>	NBS 10% de glucosa + betaína	1080 ± 15	95	95	< 1	< 1	< 1
<u>TG105</u>	NBS + betaína	969 ± 20	95	>99,9	< 1	< 1	< 1
<u>TG106</u>	NBS + betaína	1055 ± 19	95	>99,9	< 1	< 1	< 1
<u>TG107</u>	NBS + betaína	1135 ± 18	96	>99,9	< 1	< 1	< 1
<u>TG108</u>	NBS + betaína	1287 ± 15	98	>99,9	< 1	< 1	< 1
TG112	NBS 10% de glucosa + betaína	926 ± 13	95	>99,9	< 1	< 1	< 1
TG113	NBS + betaína	1068 ± 32	95	>99,9	< 1	< 1	< 1
TG114	NBS + betaína	1314 ± 48	98	>99,9	< 1	< 1	< 1

^a Medio de sales minerales NBS que contiene 12% (p/v) de glucosa (pH 7,0) a menos que se especifique lo contrario. Donde se indique, también se añadió 1 mM de betaína. Las cepas en negrita producen **D**-(-)-lactato. Las cepas subrayadas producen **L**-(+)-lactato.

^b Los rendimientos se basan en azúcar metabolizado asumiendo un rendimiento teórico máximo de 2 moles de lactato por mol de hexosa (igual conversión de peso).

Tabla 9. Productividad de lactato por *E. coli* B genéticamente modificada

Cepa ^a	Título de lactato (mmol l ⁻¹)	Rendimiento celular (g l ⁻¹)	Productividad volumétrica ^f (mmol l ⁻¹ h ⁻¹)	Productividad específica ^f (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Productividad volumétrica ^f (g ⁻¹ h ⁻¹)
SZ194 ^b	1228	1,70	23,3	13,7	2,10
<u>TG103</u> ^e	1083	2,12	30,1	14,2	2,71
<u>TG105</u> ^e	969	1,84	21,1	11,5	1,90
<u>TG106</u>	1055	1,98	24,1	12,1	2,17
<u>TG107</u>	1135	2,21	26,7	12,1	2,40
<u>TG108</u>	1287	2,29	26,2	11,4	2,29
<u>TG108</u> ^c	1273	2,15	26,4	12,3	2,37
<u>TG108</u> ^d	1268	2,36	30,0	12,7	2,70
TG112 ^e	926	1,84	20,4	11,1	1,84
TG113	1068	1,90	21,3	11,2	1,92
TG114	1314	2,31	32,2	13,9	2,88
TG114 ^c	1204	2,05	33,9	16,6	3,05

TG114^d	1202	2,16	36,1	16,7	3,25
^a Sales minerales (NBS) que contienen 12% (p/v) de glucosa, 1 mM de betaína, controlado a pH 7,0 (a menos que se especifique lo contrario). Las cepas en negrita producen D -(-)-lactato. Las cepas subrayadas producen L -(+)-lactato. ^b pH controlado a 7,5. ^c 5% de inóculo. ^d 10% de inóculo. ^e 10% de glucosa. ^f Valores calculados según el promedio para el periodo de 24 h más productivo.					

Tabla 10. Producción de lactato quiral a partir de glucosa por bacterias, levaduras y hongos						
Organismos	Medios, sustrato y condiciones de proceso	Lactato (g l ⁻¹)	Rendimiento (%)	Productividad volumétrica (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Isómero y pureza	Referencia
<i>E. coli</i> TG114	sales, 1mM de lote de betaína, glucosa, 120 g l ⁻¹	118	98	2,88	D-(-) >99,9%	Este estudio
<i>E. coli</i> JP203	medio rico (LB) dos pasos, glucosa lote alimentada, 115 g l ⁻¹	62	54	1,09	D-(-) No proporcionado	Chang <i>et al.</i> 1999
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> mutante DP3	extracto de levadura, glucosa lote alimentada, 210 g l ⁻¹	117	56	6,5	D-(-) No proporcionado	Demirci <i>et al.</i> 1992
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CD590	medio rico (YPD), glucosa microaeróbica, 100 g l ⁻¹	81	81	1,5	D-(-) 99 %	Rajgarhia <i>et al.</i> 2004
<i>E. coli</i> TG 108	sales, 1mM lote de betaína, glucosa, 120 g l ⁻¹	116	98	2,3	L-(+) >99,9%	Este estudio
<i>E. coli</i> JP204 (pLS65)	medio rico (LB), dos pasos, glucosa lote alimentada, 155 g l ⁻¹	47	30	0,7	L-(+) No proporcionado	Chang <i>et al.</i> 1999
<i>E. coli</i> FBR11 (pVALDH1)	medio rico (LB), lote simple, glucosa, 100 g l ⁻¹	73	73	2,3	L-(+) No proporcionado	Dien <i>et al.</i> 2001
<i>Kluyveromyces lactis</i> BM3-12D (pLAZ10)	extracto de levadura y lote alimentado de vitaminas, glucosa de aireación, 110 g l ⁻¹	60	55	No proporcionado	L-(+) No proporcionado	Bianchi <i>et al.</i> 2001
<i>Kluyveromyces lactis</i> PMI/C1 (pEPL2)	extracto de levadura y licor de maceración de maíz, lote alimentado con aireación, glucosa, 200 g l ⁻¹	109	55	No proporcionado	L-(+) No proporcionado	Porro <i>et al.</i> 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RWB850- 2	suplementado con vitamina, dos pasos glucosa, 18 g l ⁻¹	12	67	No proporcionado	L-(+) No proporcionado	Van Maris <i>et al.</i> 2004b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OC2T T165R	extracto de levadura, azúcar de jugo de caña, 200 g l ⁻¹	122	61	No proporcionado	L-(+) 99,9%	Saitoh <i>et al.</i> 2005

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RWB876	suplemento de vitamina, lote simple glucosa, 74 g l ⁻¹	61	82	No proporcionado	L-(+) No proporcionado	Liu <i>et al.</i> 2005
<i>Lactobacillus helveticus</i> GRL89	extracto de levadura, lote simple lactosa, 81 g l ⁻¹	75	92	3,2	L-(+) Not reported	Kyla-Nikkila <i>et al.</i> 2000
<i>Lactobacillus</i> sp. NRRL B-30574	extracto de levadura, lote simple glucosa, 130 g l ⁻¹	103	79	No proporcionado	L-(+) 100%	Eddington <i>et al.</i> 2004
<i>Rhizopus oryzae</i> ADM 34.31	urea y medio rico, lote de elevación por aire glucosa 120 g l ⁻¹	109	89	1,3	L-(+) No proporcionado	Liaw 2003

Tabla 11. Cepas de *E. coli*, plásmidos y cebadores usados en este estudio

<u>Plásmido o cepa</u>	Características relevantes	Fuentes
TG114 (NRRL B-30928)	Δ focA-pflB::FRT, Δ adhE::FRT, Δ ackA:: FRT, Δ frdA:: <i>E. chrysanthemi</i> celY, Δ frdBC::FRT, <i>lacA</i> : <i>K. oxytoca</i> cas AB, Δ mgsA::FRT	Grabar, <i>et al.</i> 2006
TG117	TG114, Δ frdBC::FRT-cat-sacB-FRT	Este estudio
TG118	Δ focA-pflB::FRT, Δ adhE::FRT, Δ ack4:: FRT, Δ frdBC, <i>lacA</i> : <i>K. oxytoca</i> cas AB, Δ mgsA::FRT	Este estudio
TG119	TG 118, Δ ackA::FRT-cat-sacB-FRT	Este estudio
TG120	Δ focA-pflB::FRT, Δ adhE::FRT, Δ ackA, Δ frdBC, <i>lacA</i> : <i>K. oxytoca</i> cas AB, Δ mgsA::FRT	Este estudio
TG121	TG 120, Δ lacZ-cynX (<i>lacZ'</i> -sacB-cat-cynX')	Este estudio
TG122	Δ focA-pflB::FRT, Δ adhE::FRT, Δ ackA, Δ frdBC, Δ mgsA::FRT	Este estudio
TG123	TG122, Δ mgsA::FRT-cat-sacB-FRT	Este estudio
TG124	Δ focA-pflB::FRT, Δ adhE::FRT, Δ ackA, Δ frdBC, Δ mgsA	Este estudio
TG125	TG124, Δ focA-pflB:FRT-cat-sacB-FRT	Este estudio
TG126	Δ focA-pflB, Δ adhE::FRT, Δ ackA, Δ frdBC, Δ mgsA	Este estudio
TG127	TG126, Δ adhE::FRT-cat-sacB-FRT	Este estudio
TG128 (NRRL B-30962)	Δ focA-pflB, Δ adhE, Δ ackA, Δ frdBC, Δ mgsA	Este estudio
TG129 (NRRL B-30963)	TG128, crecimiento mejorado a 39°C	Este estudio
TG130 (NRRL B-30964)	TG129, crecimiento mejorado a 43°C	Este estudio
<u>Plásmidos</u>		

pKD46	<i>bla</i> $\gamma\beta$ <i>exo</i> (recombinasa Red), replicón pSC101 condicional de temperatura	Datsenko y Wanner (2000)
pFT-A	<i>bla</i> <i>flp</i> replicón pSC101 condicional de temperatura	Posfai <i>et al.</i> (1997)
pELO4	<i>cat</i> <i>sacB</i>	Lee <i>et al.</i> (2001); Ausubel <i>et al.</i> (2005)
pLOI4151	FRT <i>cat</i> <i>sacB</i>	Este estudio
PLOI3956	' <i>lacZ'</i> <i>lacY</i> <i>lacA</i> <i>cynX'</i> TOPO clonado	Este estudio
PLOI3957	' <i>lacZ'</i> <i>sacB</i> <i>cat</i> <i>cynX'</i>	Este estudio
pLOI4411	' <i>frdA</i> . <i>frdB</i> . <i>frdC</i> <i>frdD'</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4412	' <i>ackA'</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4413	<i>ychE'</i> <i>adhE</i> <i>ychG'</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4415	<i>focA</i> - <i>pflB</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4416	' <i>yccT</i> <i>mgsA</i> ' <i>helD</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4417	pLOI4411, Δ <i>frdBC</i>	Este estudio
pLOI4418	pLOI4412, Δ <i>ackA</i>	Este estudio
pLOI4419	pLOI4413, Δ <i>adhE</i>	Este estudio
pLOI4421	pLOI4415, Δ / <i>ocA</i> - <i>pflB</i>	Este estudio
pLOI4422	pLOI4416, Δ <i>mgsA</i>	Este estudio
<u>Cebadores</u>		
Cebador de sentido para amplificación de <i>FRT-cat-sacB</i>	tggtgctgcaaggcgattaag (SEQ ID N°: 9)	Este estudio
Cebador de antisentido para amplificación de <i>FRT-cat-sacB</i>	ttcgatcacggcagcatcat (SEQ ID N°: 10)	Este estudio
Cebador de sentido para amplificación de <i>cat- sacB</i> con sitio <i>NheI</i> 5'	ttagctagcatgtgacggaag (SEQ ID N°: 11)	Este estudio
Cebador de antisentido para amplificación de <i>cat-sacB</i> con sitio <i>NheI</i> 5'	ccgctagcatcaaagggaag (SEQ ID N°: 12)	Este estudio
Cebador de sentido para clonación de <i>frdABCD</i>	ctggagtacagcgagctgaagat (SEQ ID N°: 13)	Este estudio
Cebador de antisentido para clonación de <i>frdABCD</i>	cagaacgcgctcgtagctca (SEQ ID N°: 14)	Este estudio
Cebador de sentido para clonación de <i>ackA</i>	gaactgcggtagtcttactg (SEQ ID N°: 15)	Este estudio
Cebador de antisentido para clonación de <i>ackA</i>	gcgtctgcgcgataaccag (SEQ ID NO:16)	Este estudio
Cebador de sentido para clonación de <i>lacZ cynX</i>	gaagtgaccagcgaatacct (SEQ ID N°: 17)	Este estudio
Cebador de antisentido para clonación de <i>lacZ cynX</i>	ggtgatgccttcggtgatta (SEQ ID N°: 18)	Este estudio
Cebador de sentido para clonación de <i>mgsA</i>	gctattccaccgcagcttca (SEQ ID N°: 19)	Este estudio

Cebador de antisentido para clonación de <i>mgsA</i>	ttatggaagaggcgctactgc (SEQ ID N°: 20)	Este estudio
Cebador de sentido para clonación de <i>focA-pflA</i>	agatcgccagccgctgcaat (SEQ ID N°: 21)	Este estudio
Cebador de antisentido para clonación de <i>focA-pflB</i>	aaccgttggtgtccagacag (SEQ ID N°: 22)	Este estudio
Cebador de sentido para clonación de <i>adhE</i>	ccgctgtctgataactggtc (SEQ ID N°: 23)	Este estudio
Cebador de antisentido para clonación de <i>adhE</i>	gcataagcggatggctactg (SEQ ID N°: 24)	Este estudio
Cebador de sentido para delección de <i>frdBC</i>	P-gtgggtgccaccatcgtaat (SEQ ID N°: 25)	Este estudio
Cebador de antisentido para delección de <i>frdBC</i>	P-cgccttctccttctattgg (SEQ ID N°: 26)	Este estudio
Cebador de sentido para delección de <i>ackA</i>	P-ctggacgctgtgtattcactg (SEQ ID N°: 27)	Este estudio
Cebador de antisentido para delección de <i>ackA</i>	P-gttgagcgcttcgctgtgag (SEQ ID N°: 28)	Este estudio
Cebador antisentido <i>lacZ</i> con sitio <i>NheI</i> 5'	acgctagctctgacaatggca (SEQ ID N°: 29)	Este estudio
Cebador antisentido <i>cynX</i> con sitio <i>NheI</i> 5'	acgctagcattgccgctgata (SEQ ID N°: 30)	Este estudio
Cebador de sentido para delección de <i>mgsA</i>	P-agcgttatctcgggaccgt (SEQ ID N°: 31)	Este estudio
Cebador de antisentido para delección de <i>mgsA</i>	P-aagtgcgagtcgctcagttcc (SEQ ID N°: 32)	Este estudio
Cebador de sentido para delección de <i>focA-pflB</i>	P-gcagcaggacgttattactc (SEQ ID N°: 33)	Este estudio
Cebador de antisentido para delección de <i>focA-pflB</i>	P-gcctacattgcgttaggtatt (SEQ ID N°: 34)	Este estudio
Cebador de sentido para delección de <i>adhE</i>	P-gctgtccggctaaagctga (SEQ ID N°: 35)	Este estudio
Cebador de antisentido para delección de <i>adhE</i>	P-acgctctacgagtcggttaag (SEQ ID N°: 36)	Este estudio

Tabla 12. Secuencia parcial de región de delecciones

Cepa/ gen	Secuencia parcial ^a	ADN foráneo (pb)
TG114 <i>frdABC</i>	<u>GCCAATAAGAAGGAGAAGGCGAATGCATCTGATAGATTGTTTTTAAAAAATTGTTTTTGG</u> <u>CTCTCGACAATTTCCAACAACATCCCTATATTTATCCCATCTAAAAGGCCTCTACCTTGA</u> <u>AAAGGCGAGGCTACCTGCTTGTTTTTTCGGGACAGGATCCTCTAGAGTCAACCTGCTTGT</u> <u>ACTCGTGATCCCATTCACAAGGGCGAATTAATTCGCCCTTCTGTTCGGTTACCAACACTG</u> <u>AGCCGGACAGTAATGGGAAAGCCAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTT</u> <u>TCTAGAGAAATAGGAACCTTCGGAATAGGAACCTAAGGAGGATATTCATATCGTGCTTCCAC</u> <u>CATCGTAATCCTGTT</u> ^b (SEQ ID NO: 37)	322
TG128 <i>frdABC</i>	GCCAATAAGAAGGAGAAGGCG-GTGTTGCCACCATCGTAATCCTGTT ^c (SEQ ID N°: 38)	0

TG114 <i>ackA</i>	CTCACAGCGAAGCGCTCAACTTTATCGT TAATACTATTCTGGCACAAAAACCAGAACTGT CTGCGCAGCTGACTGCTATCGGTCAACGTATCGTACACGGCGCGGAAAAGTATACCAGCT CCGTAGTGATCGATGAGTCTGTTATTCAGGGTATCAAGATGCAGCTTCTTTTGCACCGC TGCACAACCCGGCTCACCTGATCGGTATCGAAGAAGCTCTGAAATCTTTCCACAGCTGA AAGACAAAAACGTTGCTGTATTGTACACCGCGTTCCACACAGACTATGCCGGAAGAGTCTT ACCTCTACGCCCTGCCTTACAACCTGTACAAAGAGCACGGCATCCGTCGTTACGGGCGCGC ACGGCACCCAGCCACTTCTATGTAACCCAGGAAGCGGCAAAAATGCTGAACAAACCGGTAG AAGAACTGAACATCATCACCTGCCACCTGGGCAACGGTGGTTCCGTTTCGCTATCCGCA ACGGTAAATGCGTTGACACCTCTATGGGCCTGACCCCGCTGGAAGGTCTGGTCATGGGTA CCCGTTCTGGTGATGGGGAGCTTGTGACAAATTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATA GGAACTTCGGATCAATTTCATCGGGCGCGGGAATTTCGAGCTCGGTACCCATCGATCCGGCG ATCATCTTCCACCTGCACGACACCTGGGCATGAGCGTTGACGCAATCAACAAACTGCTG ACCAAAGAGTCTGGCCTGCTGGGTCTGAACGAACTGAACAGCGACTGCCGCTATGTTGAA GACAACCTACCGACGAAAGAAGACCGGAAGCGCGCAATGAGCTTTACTGCCACCGCCTG GCGAAATACATCGGTGCCTACACTGCGCTGATGGATGGTCTCTGGACGCTGTTGTATTTC (SEQ ID NO: 39)	94
TG128 <i>ackA</i>	CTCACAGCGAAGCGCTCAA-CTGGACGCTGTTGTATTTC (SEQ ID N°: 40)	0
TG114 <i>mgsA</i>	ATGGAAGTACGCACTCGCACTT TACCTGCGCGGAAACATATGTTGAGGCTGGAGCTGCTT CGAAGTTTCTATACTTTCTAGAGAATAGGAAGTTTCGGAATAGGAAGTAAGGAGGATATTTC ATATGATATTCTGATCCCGATTATCAGCGTTATCTCGCGGACCGTCTGA (SEQ ID NO: 41)	85
TG128 <i>mgsA</i>	ATGGAAGTACGCACTCGCACTT-AGCGTTATCTCGCGGACCGTCTGA (SEQ ID N°: 42)	0
TG114 <i>focA-pflB</i>	ATAGCCTACGCAATGTAGGCTTAATGATTAGTCTGAGTTATATTACGGGGCGTTTTTTTTTA ATGCCCCGCTTTACATATATTTGCATTAAATAAATAATGTAATTATAAGGTTAAATATC GGTAATTTGTATTTAATAAATACGATCGATATTGTTACTTTATTTCGCCGTGATGCTCCCTT TTAATTAAGTGTTTTAGCGGAGGATGCGGAAAAAATTCAACTCATTGTGTTAATTTTTTAA ATTTATTTTTATTTGGATAATCAAATATTTACTCCGTATTTGCATAAAAACCATGCGAGT TACGGGCCTA TAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAG GAAGTTCGGAATAGGAAGTAAGGAGGATATTCATATGAGAACAGCAGCAGGACGTTAT (SEQ ID NO: 43)	85
TG128 <i>focA-pflB</i>	ATAGCCTACGCAATGTAGGC-GCAGCAGGACGTTAT (SEQ ID N°: 44)	0
TG114 <i>adhE</i>	AACGCACTCGTAGAGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCTATACTTTCTAGAG AATAGGAAGTTTCGGAATAGGAAGTAAGGAGGATATTCATATGGCTGCTCCGGCTAAAGCT (SEQ ID NO: 45)	84
TG128 <i>adhE</i>	AACGCACTCGTAGAGCGT-GCTGCTCCGGCTAAAGCT (SEQ ID N°: 46)	0

^a En negrita se muestran secuencias parciales de las regiones 5' y 3' del/los gen/es, en cursiva está la cicatriz FRT y subrayada la región borrada de la cepa TG128.

^b Esta región también contenía secuencia parcial del promotor de *Z. mobilis* así como secuencia parcial del gen *ce/Y* de *E. chrysanthemi* (subrayado).

^c El guión indica la región de delección.

Tabla 13. Productos de fermentaciones de glucosa

Cepa	Condiciones ^a	Lactato			Co-productos (mmol l ⁻¹)		
		mmol l ⁻¹	Rendimiento (%) ^b	Pureza quirál (%)	Succinato	Acetato	Etanol
TG114	FMS, 37°C	1314 ± 48	98	>99,9	< 1	< 1	< 1
TG128	FMS, 37°C	1157 ± 37	96	>99,9	< 1	< 1	< 1
TG128	FMS, 39°C	865 ± 12	95	>99,9	< 1	< 1	< 1
TG128	FMS, 43°C			>99,9	< 1	< 1	< 1
TG129	FMS, 39°C	1063 ± 26	96	>99,9	< 1	< 1	< 1
TG129	FMS, 43°C	934 ± 18	94	>99,9	< 1	< 1	< 1
TG130	FMS, 43°C	1149 ± 49	97	>99,9	< 1	1	< 1

^a Sales minerales (NBS) que contienen 12% (p/v) de glucosa, 1 mM de betaína, controlado a pH 7,0.

^b Rendimiento basado en azúcar metabolizado asumiendo un rendimiento teórico máximo de 2 moles de lactato por mol de hexosa (igual conversión de peso).

[0104] Se debe entender que los ejemplos y formas de realización descritas en este caso son sólo con fines ilustrativos y a los expertos en la técnica se les ocurrirán modificaciones o cambios a la luz de los mismos.

5

Referencias

[0105]

- 10 Patente de EEUU N°: 4.963.486
 Solicitud de patente publicada en EEUU N°: 20040005677
 Solicitud de patente publicada en EEUU N°: 20030003553
 Solicitud de patente publicada en EEUU N°: 20050112737
 Solicitud de patente publicada en EEUU N°: 20040029256
- 15 WO 99/14335
 Adachi *et al.* (1998) "Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value" J. Ferment. Bioeng. 86:284-289.
 Agrawal, A.K. (2003) "Advances in the production of poly(lactic acid) fibers. A review." J. Macromolec. Science-Polymer Rev., 4:479-503.
- 20 Amtzen, C.E., Dale, B.E. (1999) Biobased industrial products, priorities for research and commercialization, National Academy Press, Washington, D.C.
 Ausubel, F.M. *et al.* (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.
 Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Deidman, J.A. Smith and K. Struhl (eds.) (2005) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.
- 25 Axe, D.D. and J.E. Bailey (1995) "Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*" Biotechnol. Bioeng. 47:8-19.
 Badia, J., Gimenez, R., Baldoma, L., Barnes, E., Fessner, W.D., Aguilar, J. (1991) "L-lyxose metabolism employs the L-rhamnose pathway in mutant-cells of *Escherichia coli*-adapted to grow on xylose" J. Bacteriol. 173:5144-5150.
- 30 Bianchi, M.M., Brambilla, L., Protani, F., Liu, C., Lievense, Porro, D. (2001) "Efficient homolactic fermentation by *Kluveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with heterologous LDH gene" Appl. Environ. Microbiol. 67:5621-5625.
 Causey, T.B. *et al.* (2004) "Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2235-2240.
- 35 Chang, D.E. *et al.* (1999) "Homofermentative production of D-(-) or L-(+) lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1" Appl Environ Microbiol 65:1384-1389.
 Chotani, G. *et al.* (2000) "The commercial production of chemicals using pathway engineering" Biochim. Biophys. Acta 1543:434-455.
- 40 Datsenko, K.A., Wanner, B.L. (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645.
 Datta, R. *et al.* (1995) "Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives" FEMS Microbiol. Rev. 16:221-231.
 Demirci, A. and A.L. Pometto (1992) "Enhanced production of D-(-)-lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC9649" J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 11:23-28.

- Dien, B.S. *et al.* (2001) "Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars" *J Ind. Microbiol Biotechnol.* 27:259-264.
- Grabar, T.B. *et al.* (2006) "Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in L(+) and D(-) lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*" *Biotechnology Letters*, in publication.
- 5 Hofvendahl, K., and Hahn-Hagerdal, B. (2000) "Factors affecting fermentative lactic acid production from renewable resources" *Enzy. Microbiol. Technol* 26:87-107.
- Konings, W. N. (2002) "The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria" *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 3-27.
- 10 Kyla-Nikkila, K. *et al.* (2000) "Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNR32 for production of pure L-(+)-lactic acid" *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3835-3841.
- Lee, E-C., Yu, K., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2001) "A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA" *Genomics* 73: 56-65.
- 15 Maniatis, T. *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory.
- Martinez-Morales, F. *et al.* (1999) "Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons during construction" *J Bacteriol.*, 181:7143-7148.
- Michels, P. A. M. *et al.* (1979) "Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products" *FEMS Microbiol. Lett.* 5:357-364.
- 20 Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*, Cold Spring Harbor Press.
- Moniruzzaman, M. *et al.* (1997) "Isolation and molecular characterization of high-performance cellobiose-fermenting spontaneous mutants of ethanologenic *Escherichia coli* K011 containing the *Klebsiella oxytoca* casAB operon" *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4633-4637.
- Narayanan *et al.* (2004) "L-(+) lactic acid fermentation and its product polymerization," *Elect. J. Biotechnol.* 7:167-179.
- 25 Ohara, H. *et al.* (2001) "Development of industrial production of high molecular weight poly-L-lactate from renewable resources" *Nippon Kagaku Kaishi* 6:323-331.
- Ohta, K. *et al.* (1991) "Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production by chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II" *Appl Environ Microbiol.* 57:893-900.
- 30 Poolman, B. (2002) "Transporters and their roles in LAB cell physiology" *Antonie van Leeuwenhoek* 82:147-164.
- Porro, D. *et al.* (1999) "Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts" *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4211-4215.
- Posfai, G., Koob, M.D., Kirkpatrick, H.A., Blattner, F.C. (1997) "Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: Isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome" *J. Bacteriol.* 179:4426-4428.
- 35 Purvis, J.E. *et al.* (2005) "Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress" *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3761-3769.
- Saitoh, S. *et al.* (2005) "Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity" *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2789-2792.
- 40 Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press.
- Shukla, V.B. *et al.* (2004) "Production of D-(-)-lactate from sucrose and molasses," *Biotechnol Lett.*, 26:689-693.
- 45 van Maris, A. J. A. *et al.* (2004a) "Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes" *Metabolic Engineering* 6:245-255.
- van Maris, A. J. A. *et al.* (2004b) "Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export" *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5): 2898-2905.
- 50 Warnecke, T. and R.T. Gill (2005) "Organic acid toxicity, tolerance, and production of *Escherichia coli* biorefining applications" *Microbial Cell Factories* 4:25.
- Zhou S., Ingram L.O. (1999) "Engineering endoglucanase-secreting strains of ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2" *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22:600-607.
- Zhou, S. *et al.* (2003) "Production of optically pure D-lactic acid in mineral salt medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110" *Appl Environ Microbiol.* 69:399-407.
- 55 Zhou, S. *et al.* (2003a) "Productions of optically pure D-lactic acid in mineral salt medium by metabolically engineered *Escherichia coli* D-(-)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*" *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2237-2244.
- Zhou, S., Yomano, L.P., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2005) "Fermentation of 10% (w/v) sugar to D-(-)-lactate by engineered *Escherichia coli* B" *Biotechnol. Lett.* 27:1891-1896.
- 60 Zhou, S., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., Grabar, T.B., Ingram, L.O. (2006) "Fermentation of 12% (w/v) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* B strain SZ194 using mineral salts medium" *Biotechnol. Lett.* 28:663-670.
- Zhu, J. and Shimizu, K. (2004) "The effect of *pfl* gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*" *Appl Microbiol and Biotechnol.* 64:367-375.

Listado de secuencias

[0106]

5 <110> Zhou, Shengde
Ingram, Lonnie O'Neal
Shanmugam, Keelnatham T.
Yomano, Lorraine
Grabar, Tammy B.
10 Moore, Jonathan C.

<120> Materiales y métodos para producción eficiente de ácido láctico

<130> UF-457C2XC1

15 <150> US 60/706.887
<151> 2005-08-10

<150> US 60/761.576
20 <151> 2006-01-24

<150> US 60/799.619
<151> 2006-05-11

25 <160> 46

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
30 <211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> cebador de sentido para delección de frdBC

<400> 1
atggcctgaga tgaaaaaacct gaaaattgag gtgggtgcgct ataacgtgta ggctggagct 60
gcttc 65

40 <210> 2
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> cebador antisentido para delección de frdBC

<400> 2
ttaccagtac agggcaacaa acaggattac gatgggtggca accaccatat gaatatcctc 60
cttag 65

50 <210> 3
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> cebador de sentido para delección de adhE

<400> 3

	atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
5	<210> 4 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> cebador antisentido para delección de adhE	
	<400> 4 ttaagcggat ttttcgctt tttctcagc tttagccgga gcagccatat gaatatcctc	60
	cttag	65
15	<210> 5 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> cebador de sentido para delección de celY	
	<400> 5 gataaggcgg aagcagccaa taagaaggag aaggcgaatg gctgagtgtg ggctggagct	60
	gcttc	65
25	<210> 6 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> cebador antisentido para delección de celY	
	<400> 6 ccagaatacc ggttcgtcag aacgccttgg atttggatta atcatcatat gaatatcctc	60
35	cttag	65
40	<210> 7 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> cebador de sentido para delección de mgsA	
	<400> 7 atgtacatta tggaactgac gactcgcact ttacctgcgc ggaaacatat gtgtaggctg	60
45	gagctgcttc	70
50	<210> 8 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> cebador antisentido para delección de mgsA	

ES 2 401 339 T3

	<400> 8		
	ttacttcaga cggtcgcga gataacgctg ataatcgggg atcagaatat catatgaata	60	
	tectecttag	70	
5	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
10	<220> <223> cebador de sentido para amplificación de FRT-cat-sacB		
	<400> 9		
	tgtgctgcaa ggcgattaag	20	
15	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
20	<220> <223> cebador antisentido para amplificación de FRT-cat-sacB		
	<400> 10		
25	ttcgatcacg gcacgatcat	20	
	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
30	<220> <223> cebador de sentido para amplificación de cat-sacS con sitio NheI 5'		
	<400> 11		
35	ttagctagca tgtgacggaa g	21	
	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
40	<220> <223> cebador antisentido para amplificación de cat-sacS con sitio NheI 5'		
45	<400> 12		
	ccgctagcat caaagggaaa a	21	
	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
50	<220> <223> cebador de sentido para clonación de frdABCD		
55	<400> 13		
	ctggagtaca gcgacgtgaa gat	23	
60	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		

<220>
 <223> cebador antisentido para clonación de frdABCD

5 <400> 14
 cagaacgcgc tcgtagctca 20

<210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador de sentido para clonación de ackA

15 <400> 15
 gaactgcggt agttctcac tg 22

<210> 16
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador antisentido para clonación de ackA

25 <400> 16
 gcgtcttcgc cgataaccag 20

<210> 17
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> cebador de sentido para clonación de lacZ-cynX

<400> 17
 gaagtgaacca gcgaatacct 20

40 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> cebador antisentido para clonación de lacZ-cynX

<400> 18
 50 ggtgatgcct tcggtgatta 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Cebador de sentido para clonación de mgsA

<400> 19
 60 gctattccac cgcagctca 20

<210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador antisentido para clonación de mgsA

 <400> 20
 5 ttatggaaga ggcgctactg c 21

 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador de sentido para clonación de focA-pflB

 <400> 21
 15 agatcgccag ccgctgcaat 20

 <210> 22
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador antisentido para clonación de focA-pflB
 25
 <400> 22
 aaccgttggt gtccagacag 20

 <210> 23
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> cebador de sentido para clonación de adhE

 <400> 23
 ccgctgtctg ataactggtc 20

 <210> 24
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> cebador antisentido para clonación de adhE

 <400> 24
 50 gcataagcgg atggctactg 20

 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> cebador de sentido para delección de frdBC

 <400> 25
 60 gtggttgcca ccatcgtaat 20

 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador antisentido para delección de frdBC

 <400> 26
 5 cgcttctcc ttctattgg 20

 <210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador de sentido para delección de ackA

 <400> 27
 15 ctggacgctg ttgtattcac tg 22

 <210> 28
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador antisentido para delección de ackA

 <400> 28
 25 gttgagcgct tcgctgtgag 20

 <210> 29
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> antisentido lacZ con sitio NheI 5'

 <400> 29
 acgctagctc tgacaatggc a 21

 <210> 30
 40 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> antisentido cynX con sitio NheI 5'

 <400> 30
 50 acgctagcat tgccgctgat a 21

 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> cebador de sentido para delección de mgsA

 <400> 31
 60 agcgttatct cgcgaccgt 20

 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador antisentido para delección de mgsA

 <400> 32
 5 aagtcgagtc cgtcagttcc 20

 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador de sentido para delección de focA-pflB

 <400> 33
 15 gcagcaggac gttattactc 20

 <210> 34
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador antisentido para delección de focA-pflB
 25
 <400> 34
 gcctacattg cgtaggctat t 21

 <210> 35
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> cebador de sentido para delección de adhE

 <400> 35
 gctgctccgg ctaaagctga 20

 <210> 36
 40 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> cebador antisentido para delección de adhE

 <400> 36
 50 acgctctacg agtgcgtaa g 21

 <210> 37
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 55
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (1)..(375)
 <223> secuencia parcial de genoma del microorganismo antes de la delección de la cicatriz FRT
 60
 <400> 37

	gccaataaga aggagaaggc gaatggatct gatagattgt ttttaaaaaa ttgtttttgg	60
	ctctcgacaa ttccaacaa catccctata ttatcccat ctaaaaggcc tctacottga	120
	aaaggcgagg ctacctgctt gtttttcggg acaggatcct cttagagtaa cctgcttggt	180
	actcgtgato ccattcacia gggcgaatta attcgccctt ctgttcctgt accaaccctg	240
	agccggacag taatgggaaa gccaaagtga ggctggagct gcttcgaagt tctataactt	300
	tctagagaat aggaacttcg gaataggaa ctaaggaggat attcatatgg tggttgccac	360
	catcgtaato ctgtt	375
5	<210> 38 <211> 47 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
10	<220> <221> características diversas <222> (21)..(22) <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la delección de la cicatriz FRT; sitio de escisión entre los nucleótidos 21 y 22	
15	<400> 38 gccaataaga aggagaaggc ggtggtgcc accatcgtaa tcctgtt	47
20	<210> 39 <211> 900 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
25	<220> <221> características diversas <222> (1)..(900) <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo antes de la delección de la cicatriz FRT	
	<400> 39 ctcacagcga agcgctcaac ttatcggtta atactattct ggcacaaaaa ccagaactgt	60
	ctgcgcagct gactgctatc ggfcacogta tcgtacacgg cggcgaaaag tataccagct	120
	cogtagtgat cgatgagctt gttattcagg gtatcaaaga tgcagcttct ttgcaaccgc	180
	tgcacaaccc ggctcacctg atcgggtatcg aagaagctct gaaatcttc ccacagctga	240
	aagacaaaaa cgttcgctgta ttfgacaccg cgttcacca gactatgccg gaagagtctt	300
	acctctacgc cctgccttac aaactgtaca aagagcacgg catccgtcgt tacggcgcg	360
	acggcaccag caactttctat gtaacccagg aagoggcaaa aatgctgaac aaaccggtag	420
	aagaactgaa catcatcacc tgccacctgg gcaacgggtg ttccgtttct gctatccgca	480
	acggtaaatg cgttgacacc tctatgggac tgaccccgct ggaaggctcg gtcattgggt	540
	cccgctctgg tgatggggag cttgtcgaca attcgaagtt cctatacttt cttagaata	600
	ggaacttcgg atcaattcat cgggcgcggg aattcgagct cggtagccat cgatccggcg	660

	atcatcttcc acctgcacga caccctgggc atgagcggtg acgcaatcaa caaactgctg	720
	accaaagagt ctggcctgct gggtctgacc gaagtgaacca gogactgccc ctatgttgaa	780
	gacaactacg cgacgaaaga agacgcgaag cgcgcaatgg acgtttactg ccacgcgctg	840
	gcgaaataca tcggtgocct cactgcgctg atggatggtc gtctggacgc tgttgatttc	900
	<210> 40	
	<211> 37	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
	<221> características diversas	
10	<222> (19)..(20)	
	<223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la delección de la cicatriz FRT; sitio de escisión entre los nucleótidos 19 y 20	
	<400> 40	
15	ctcacagcga agcgctcaac tggacgctgt tgtattc	37
	<210> 41	
	<211> 170	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
	<221> características diversas	
	<222> (1)..(170)	
25	<223> secuencia parcial del genoma del microorganismo antes de la delección de la cicatriz FRT	
	<400> 41	
	atggaactga cgactcgcac ttacctgcg cggaaacata tgtgtaggct ggagctgctt	60
	cgaagttcct atactttcta gagaatagga acttcggaat aggaactaag gaggatattc	120
	atatgatatt ctgatccccg attatcagcg ttatctcgcg gaccgtctga	170
30	<210> 42	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
35	<221> características diversas	
	<222> (22)..(23)	
	<223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la delección de la cicatriz FRT; sitio de escisión entre los nucleótidos 22 y 23	
40	<400> 42	
	atggaactga cgactcgcac ttagcggtat ctcgcggacc gtctga	46
	<210> 43	
45	<211> 418	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<220>	
50	<221> características diversas	
	<222> (1)..(418)	
	<223> secuencia parcial del genoma del microorganismo antes de la delección de la cicatriz FRT	
55	<400> 43	

atagcctacg caatgtaggc ttaatgatta gtctgagtta tattacgggg cgttttttta 60
 atgccccgct ttacatatat ttgcattaat aaaataattg taattataag gttaaatact 120
 ggtaatttgt atttaataaa tacgatogat attggttactt tattcgcttg atgctccctt 180
 ttaattaact gttttagcgg aggatgcgga aaaaattcaa ctcatattgtt aattttttaa 240
 atttatTTTT atttgataa tcaaatattt actcgtatt tgcataaaaa ccattgcgagt 300
 tacgggcta taagtgtagg ctggagctgc ttgaagttc ctatactttc tagagaatag 360
 gaacttcgga ataggaacta aggaggatat tcatatgaga acagcagcag gaacttat 418
 <210> 44
 <211> 35
 <212> ADN
 5 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (20)..(21)
 10 <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la delección de la cicatriz FRT; sitio de escisión
 entre nucleótidos 20 y 21
 <400> 44
 atagcctacg caatgtaggc gcagcaggac gttat 35
 15 <210> 45
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 20 <220>
 <221> características diversas
 <222> (1)..(120)
 <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo antes de la delección de la cicatriz FRT
 25 <400> 45
 aacgcactcg tagagcgtgt gtaggctgga gctgcttoga agttcctata ctttctagag 60
 aataggaact tcggaatagg aactaaggag gatattcata tggctgctcc ggctaaagct 120
 <210> 46
 <211> 36
 30 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> características diversas
 35 <222> (18)..(19)
 <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la delección de la cicatriz FRT; sitio de escisión
 entre los nucleótidos 18 y 19
 <400> 46
 40 aacgcactcg tagagcgtgc tgctccggt aaagct 36

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada que comprende las siguientes modificaciones genéticas para la cepa de *E. coli* KO11 (ATCC 55124): a) inserción del gen casAB de *Klebsiella oxytoca* detrás del codón de terminación de lacY; b) integración del gen celY de *Erwinia chrysanthemi* en el gen frdA; c) inactivación o delección de *focA-Z. mobilis pdc-adhB-pflB*; d) inactivación o delección del gen de alcohol deshidrogenasa de *E. coli* nativa; y e) inactivación o delección del gen de acetato-quinasa (*ackA*).
2. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 1, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada comprende además genes de resistencia antibiótica inactivados o eliminados.
3. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 1, donde el gen casAB de *Klebsiella oxytoca* y el gen celY de *Erwinia chrysanthemi* se inactivan o eliminan en dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada después de la inserción.
4. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 2, donde el gen casAB de *Klebsiella oxytoca* y el gen celY de *Erwinia chrysanthemi* se inactivan o eliminan en dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada después de la inserción.
5. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 2, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se desarrolla metabólicamente para crecimiento y producción de ácido láctico mejorados.
6. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 3, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se desarrolla metabólicamente para crecimiento y producción de ácido láctico mejorados.
7. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 4, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se desarrolla metabólicamente para crecimiento y producción de ácido láctico mejorados.
8. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, donde los genes antibióticos se eliminan con recombinasa FLP.
9. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 7, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es SZ186 (NRRL B-30862).
10. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 5, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es SZ132 (NRRL B-30861).
11. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5, donde el gen *mgsA* de dicha cepa se inactiva o elimina en dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada.
12. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada que comprende la cepa de *E. coli* SZ194 (NRRL B30863) en la que el gen *mgsA* se ha inactivado o eliminado.
13. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 12, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se desarrolla metabólicamente para crecimiento y producción de ácido láctico mejorados.
14. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 13, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es TG112 (NRRL B-30926), TG113 (NRRL B-30927) o TG114 (NRRL B-30928).
15. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 11 o 12, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada comprende además un gen nativo *ldhA* inactivado o eliminado y un gen heterólogo insertado recombinante que codifica una lactato deshidrogenasa L-específica.
16. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 15, donde dicho gen de lactato dehidrogenasa L-específica heterólogo es un gen *ldhL* (por ejemplo, un gen *ldhL* obtenido de *P. acidilactici*).
17. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, donde dicha cepa se desarrolla metabólicamente para crecimiento y producción de ácido láctico mejorados.
18. Cepa de *E. coli* genéticamente modificada seleccionada del grupo que consiste en: SZ132 (NRRL B-30861); SZ186 (NRRL B-30862); SZ194 (NRRL B-30863); TG103 (NRRL B-30864); TG102 (NRRL B-30921); TG105 (NRRL B-30922); TG106 (NRRL B-30923); TG107 (NRRL B-30924); TG108 (NRRL B-30925); TG112 (NRRL B-30926); TG113 (NRRL B-30927); TG114 (NRRL B-30928); TG128 (NRRL B-30962); TG129 (NRRL B-30963); y TG130 (NRRL B-30964).

19. Método de cultivo o de desarrollo de una cepa de *E. coli* genéticamente modificada que comprende la inoculación de un medio de cultivo con una o más cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 y cultivo de dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada.
- 5 20. Método para producir D-(-)-lactato o ácido D-(-)-láctico que comprende el cultivo de una o más cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 bajo condiciones que permitan la producción de ácido D-(-)-láctico y opcionalmente neutralizar el ácido D-(-)-láctico para formar D-(-)-lactato.
- 10 21. Método según la reivindicación 20, donde dicha cepa o cepas de *E. coli* genéticamente modificadas se seleccionan de TG112 (NRRL B-30926), TG113 (NRRL B-30927), TG114 (NRRL B-30928) o SZ194 (NRRL B-30863).
- 15 22. Método para producir L-(+)-lactato o ácido L-(+)-láctico que comprende el cultivo de una o más cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquiera de las reivindicaciones 15, 16 o 17 bajo condiciones que permitan la producción de ácido L-(+)-láctico y opcionalmente neutralizar el ácido L-(+)-láctico para formar L-(+)-lactato.
- 20 23. Método según la reivindicación 22, donde dicha cepa o cepas de *E. coli* genéticamente modificadas son TG103 (NRRL B-30864), TG105 (NRRL B-30922), TG106 (NRRL B-30923), TG107 (NRRL B-30924), o TG108 (NRRL B-30925).
- 25 24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19, 20, 21, 22 o 23, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se cultiva en uno o más medios de sales minerales.
- 30 25. Método según la reivindicación 24, donde el medio de sales minerales comprende entre 2% y 20% (p/v) de un azúcar.
- 35 26. Método según la reivindicación 25, donde el medio de sales minerales contiene 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5% o 20% (p/v) de un azúcar.
- 40 27. Método según la reivindicación 25 o 26, donde el azúcar es glucosa o sacarosa o una combinación de glucosa y sacarosa.
- 45 28. Método según la reivindicación 20, donde una cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 11 se cultiva bajo condiciones que permitan la producción de D-(-)-lactato o ácido D-(-)-láctico quiralmente puro.
- 50 29. Método según la reivindicación 22, donde una cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 15, 16 o 17 se cultiva bajo condiciones que permitan la producción de L-(+)-lactato o ácido L-(+)-láctico quiralmente puro.
- 55 30. Método según la reivindicación 21, donde dicho método produce D-(-)-lactato o ácido D-(-)-láctico quiralmente puro.
- 60 31. Método según la reivindicación 23, donde dicho método produce L-(+)-lactato o ácido L-(+)-láctico quiralmente puro.
- 65 32. Método según la reivindicación 28, 29, 30 o 31, que comprende además el paso de purificación del lactato quiralmente puro.
33. Método según cualquiera de las reivindicaciones 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32, donde el lactato se produce a concentraciones de al menos 0,5M.
34. Método según la reivindicación 33, donde el medio de cultivo es un medio de sales minerales químicamente definido o medio de sales minerales NBS.
35. Método según la reivindicación 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34, donde el rendimiento de ácido láctico es de al menos 90%.
36. Método según la reivindicación 36, donde el rendimiento es de al menos 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% o 99%.
37. Método según la reivindicación 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36, donde no hay contaminación detectable de una forma estereoisomérica de ácido láctico o lactato con la otra forma estereoisomérica o la pureza quiral del estereoisómero específico es de al menos 99,9%.
38. Composición que comprende una o más cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 y medio de crecimiento.

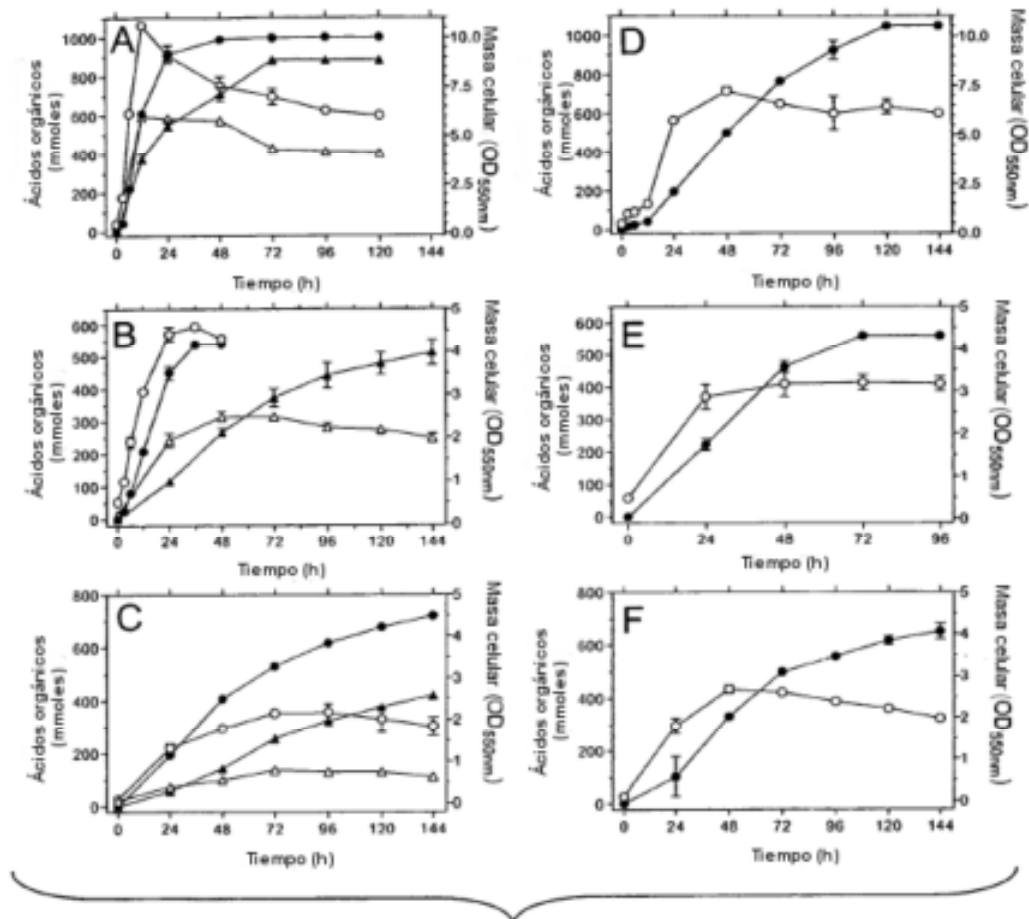


FIG. 1

FIG. 2A

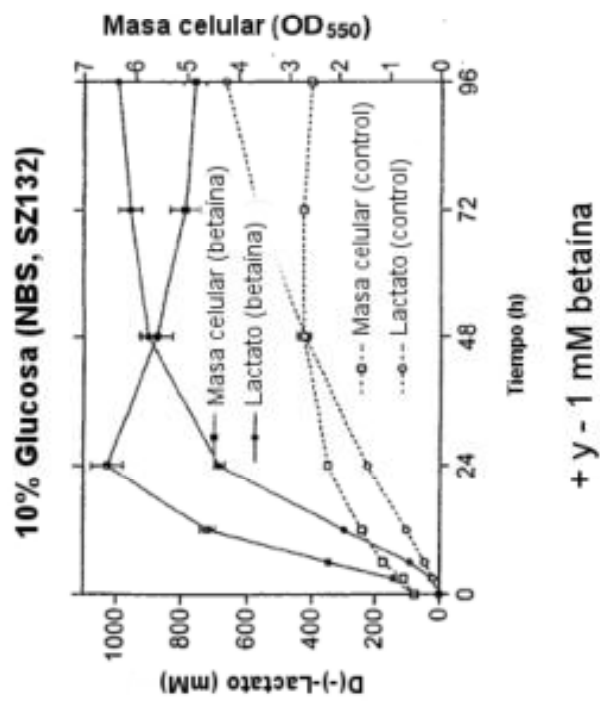


FIG. 2B

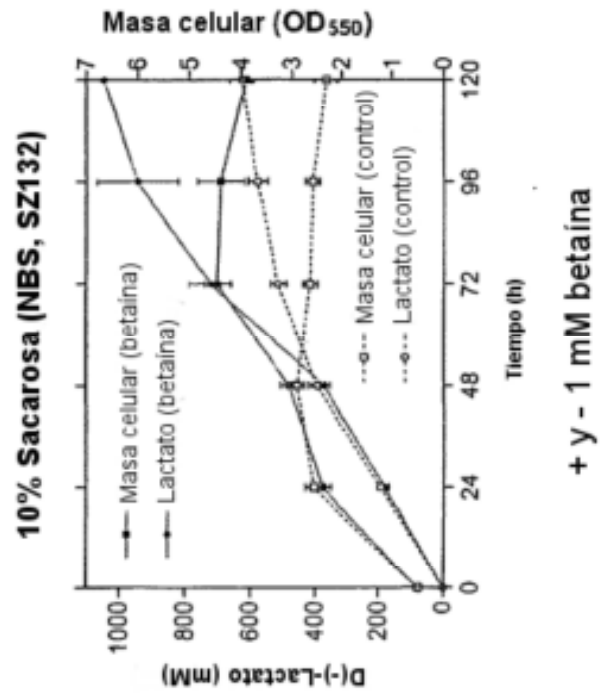


FIG. 2D

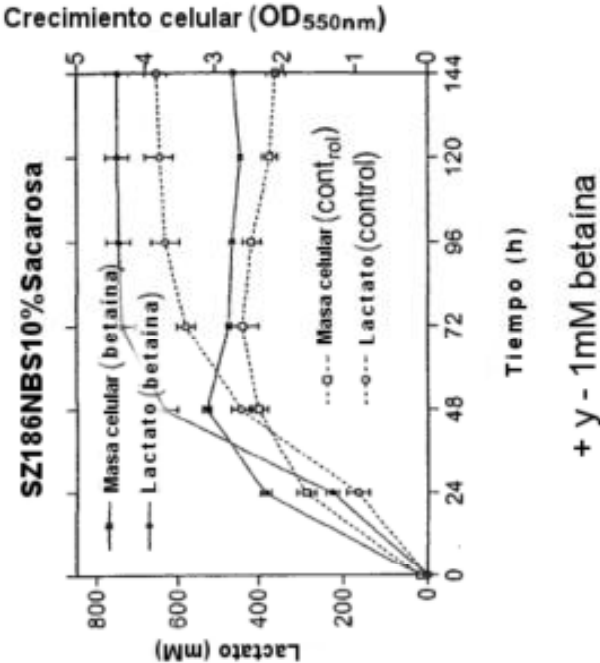
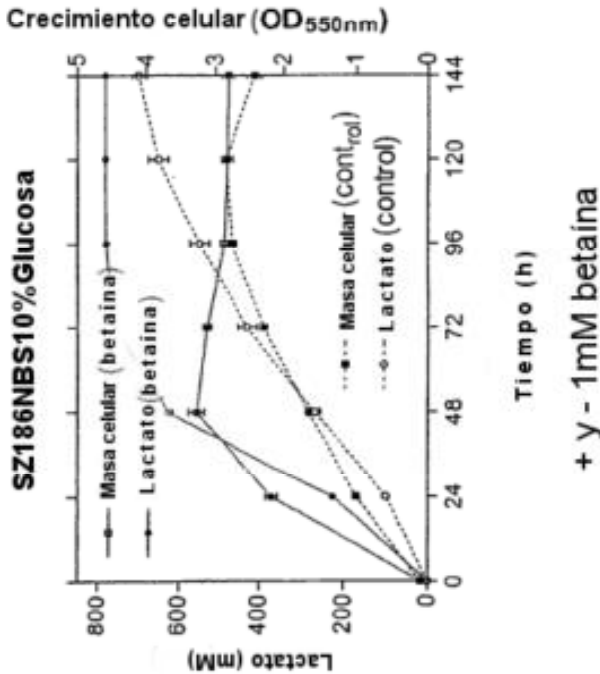


FIG. 2C



SZ186 es una cepa mejorada, productos más limpios, rendimientos más altos.

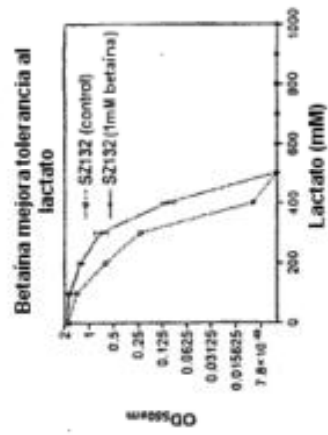


FIG. 3A

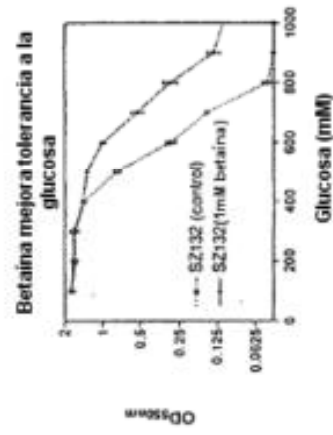


FIG. 3B

La betaina aumenta la tolerancia al ácido y la tolerancia al azúcar.

FIG. 4A

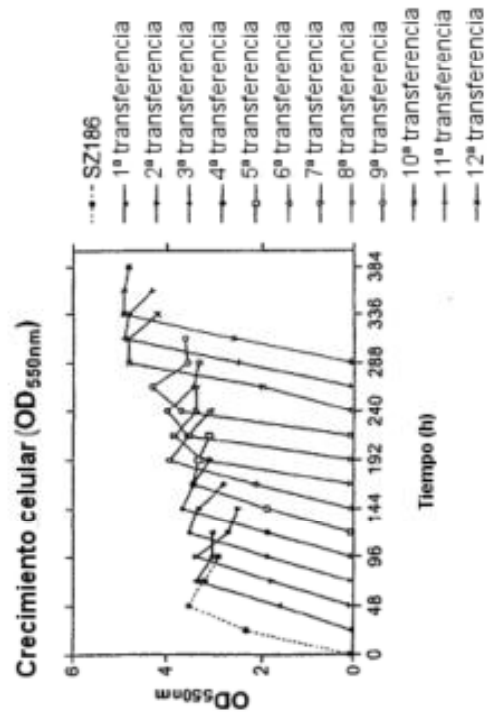
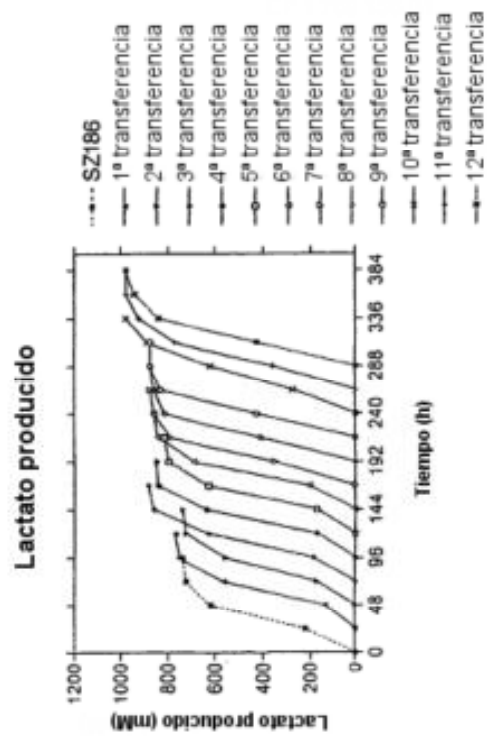
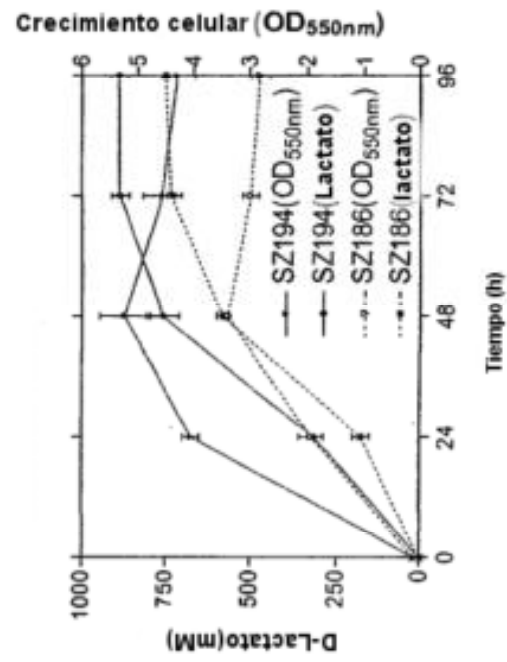


FIG. 4B



Aclimatación de la SZ186 a los medios de sales minerales, dando como resultado la cepa SZ194

FIG. 5A



La SZ194 es más rápida que la SZ186

FIG. 5B

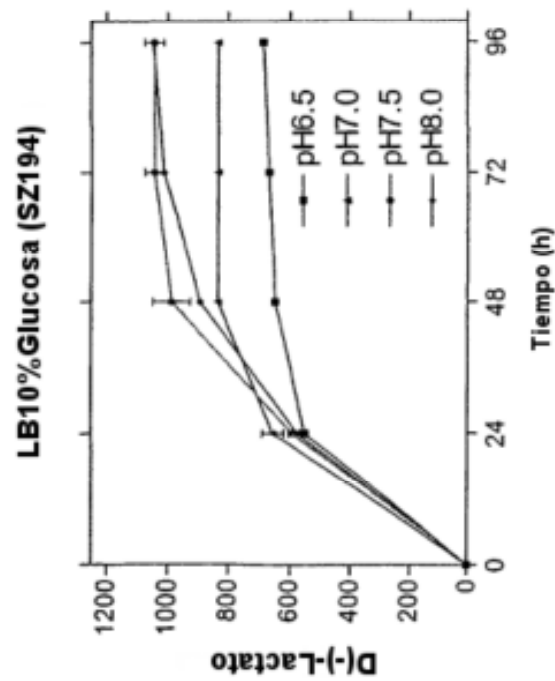
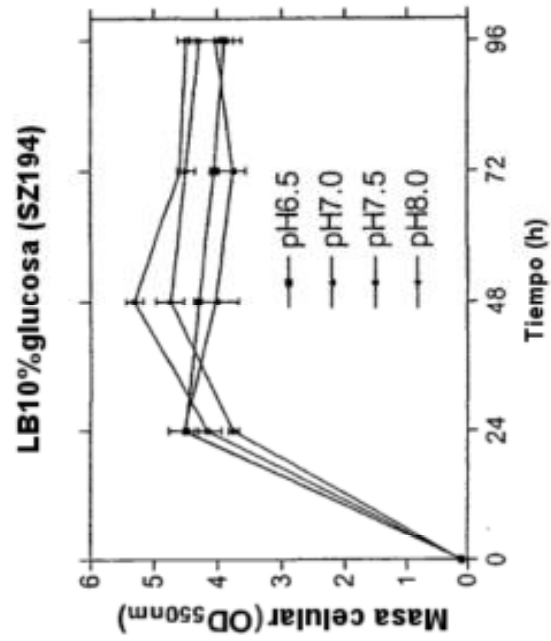


FIG. 5C



Los pH 7,5 y 8,0 son mejores que los pH 6,5 y pH 6,0

FIG. 5D

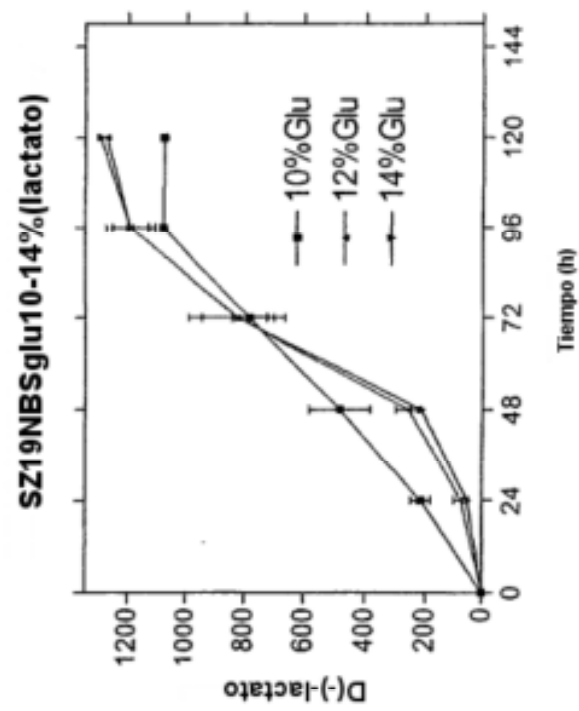
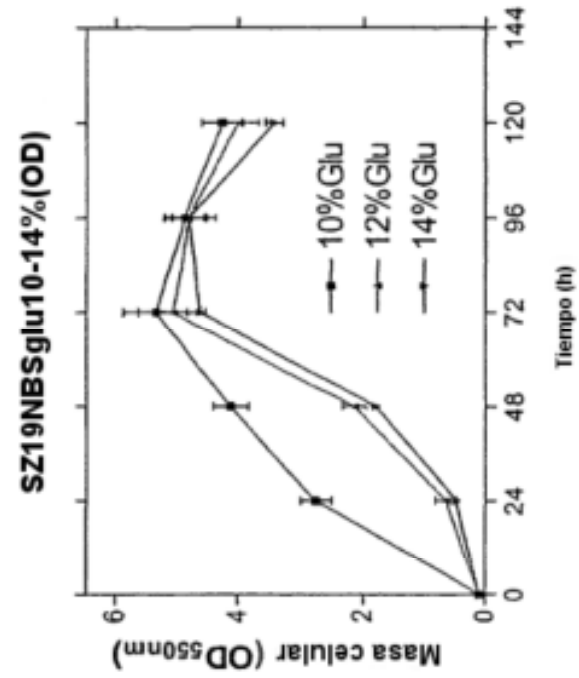


FIG. 5E



Por encima del 10% de azúcar, los cultivos se inician despacio.

FIG. 5G

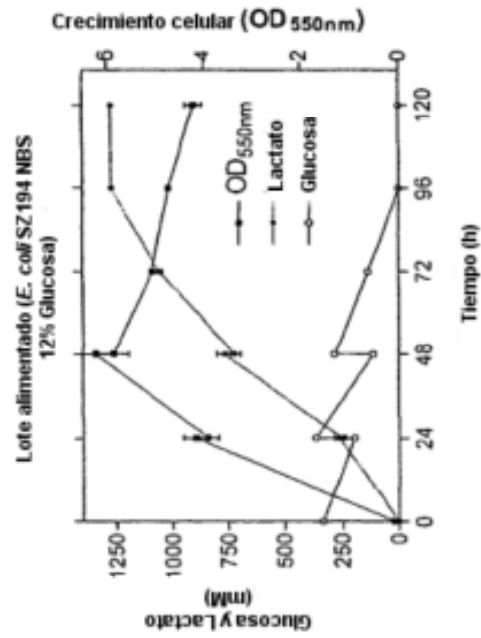
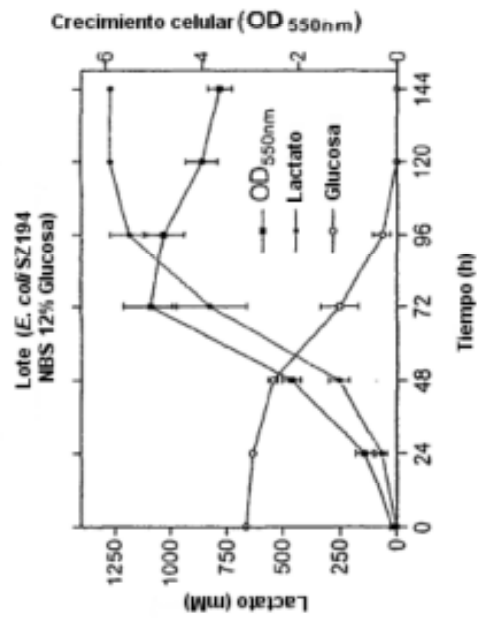


FIG. 5F



El lote alimentado ayuda a mejorar los índices, >1 M de lactato en caldos después de 72-96 h.