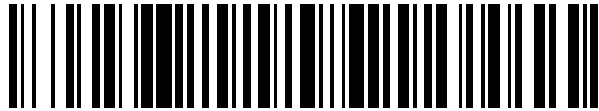


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 866**

51 Int. Cl.:

C12P 7/42 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2007 E 07737127 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2025760**

54 Título: **Procedimiento para producir ácido glicólico por regeneración de coenzima**

30 Prioridad:

09.05.2006 JP 2006129986

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

09.10.2013

73 Titular/es:

**MITSUI CHEMICALS, INC. (100.0%)
5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome Minato-ku
Tokyo 105-7117, JP**

72 Inventor/es:

**MORISHIGE, TAKASHI;
WADA, MITSUFUMI;
TAKAHASHI, HITOSHI;
MOCHIZUKI, DAISUKE y
TOKUDA, JUNKO**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 424 866 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

Procedimiento para producir ácido glicólico por regeneración de coenzima.

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un microorganismo *Escherichia coli* que produce ácido glicólico y a un procedimiento para producir ácido glicólico usando el microorganismo *E. coli*.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] Puesto que los ácidos hidroxicarboxílicos son útiles como materias primas para polímeros y un compuesto intermedio para medicamentos, se ha pedido un procedimiento para producir ácidos hidroxicarboxílicos de forma eficaz.

15

Como ejemplo, se puede mencionar el ácido glicólico (ácido α -hidroxiacético). El ácido glicólico se ha usado como una materia prima para agentes de limpieza o cosméticos, pero recientemente ha recibido atención como materia prima para el poli(ácido glicólico) que es útil como un polímero barrera frente a gases o un polímero para medicina. La razón por la que el ácido glicólico ha recibido atención como un material barrera frente a gases es que una capa de poli(ácido glicólico) tiene una alta propiedad y rendimiento de barrera frente al oxígeno como material para el envasado de alimentos o bebidas carbonatadas que se pueden estropear fácilmente en presencia de oxígeno.

20

El ácido glicólico de un producto sintetizado químicamente que está actualmente disponible en el comercio, contiene bastantes impurezas, lo cual es un problema cuando se usa como una materia prima para polímeros en vista de la pureza. Esto se debe a que estas impurezas inhiben una reacción de condensación deshidratante del ácido glicólico, y también el metoxi-acetato, que es una de estas impurezas, es un compuesto sospechoso de ser potencial carcinógeno, siendo por lo tanto deseable no incluirlo en un material de envasado para alimentos o bebidas. Técnicamente se pueden eliminar las impurezas por purificación, pero dichos productos purificados tienen un alto coste y por lo tanto no son prácticos como una materia prima para el envasado de bajo coste.

25

30

[0003] Con el fin de evitar los problemas mencionados antes dados en el ácido glicólico de los productos sintetizados químicamente, se ha intentado una producción de ácido glicólico de acuerdo con un bioprocedimiento que usa etilenglicol como una materia prima. En el documento de patente 1 y documento de patente 2, se ha descrito un procedimiento para producir ácido glicólico por un microorganismo, que incluye cultivar levadura que pertenece al género *Pichia*, género *Rhodotorula*, género *Sporobolomyces*, genus *Kluyveromyces* o género *Torulopsis*, una cepa que pertenece al género *Nocardia*, una cepa que pertenece al género *Rhodococcus*, o una cepa de *Escherichia coli B*, en un medio de cultivo que contiene etilenglicol y separar y recoger el ácido glicólico del caldo de cultivo. Entre los procedimientos para producir ácido glicólico descritos en los ejemplos del documento de patente 1 y documento de patente 2, un procedimiento que usa *Pichia naganishii* da la mayor concentración de acumulación de ácido glicólico y se obtienen 35,3 g/l de ácido glicólico mediante una reacción durante 30 h. Con respecto a la producción de ácido glicólico con el uso de *Pichia naganishii*, se ha publicado en el documento de no patente 1 que se pueden obtener 105 g/l de ácido glicólico mediante una reacción de 120 h con condiciones de reacción además mejoradas.

35

40

45

[0004] En el documento de patente 3, se ha descrito que se pueden producir ácidos hidroxicarboxílicos incluyendo ácido glicólico a partir de una materia prima tal como alcoholes polihídricos alifáticos que tienen un grupo hidroxilo al final, tal como etilenglicol, usando un microorganismo en el que se introduce un gen que codifica la lactaldehído reductasa y un gen que codifica la lactaldehído deshidrogenasa, en forma de plásmido, para así impartir o potenciar una actividad de esas enzimas, y también se describe que se mejora la capacidad de producir ácido glicólico mediante alteración de un gen que codifica la glicolato oxidasa contenido en un microorganismo, para así inactivar una actividad de la enzima.

50

En una reacción para producir ácidos hidroxicarboxílicos incluyendo el ácido glicólico, por los procedimientos convencionales mencionados antes, la cantidad de células microbianas necesarias para la reacción es grande, lo cual causa problemas tales como un aumento en el coste de producción, contaminación por impurezas derivadas de

55

las células microbianas, y se requiere mucho más trabajo y coste para desechar las células microbianas después de la producción de los ácidos hidroxicarboxílicos.

[0005] En un procedimiento para producir cetona a partir de alcohol usando una oxidasa, se ha usado una técnica como se describe a continuación, en la que el dinucleótido de nicotinamida y adenina de tipo oxidado (en lo sucesivo, se puede denominar NAD) necesario para una reacción se regenera a partir del dinucleótido de nicotinamida y adenina de tipo reducido (en lo sucesivo, se puede denominar NADH) producido junto con la reacción. Es decir, hay un procedimiento que combina dos reacciones, se combinan una reacción de oxidación para producir una cetona propuesta y una reacción de reducción de cetona para regenerar el NAD, una técnica combinada con una reacción de reducción del ácido oxoglutarico por la ácido glutámico deshidrogenasa, y similares.

En la técnica anterior para regenerar el NAD, se pueden mencionar los problemas de que es necesario añadir un sustrato de reacción para regenerar el NAD en el sistema de reacción y que se acumulan subproductos de la reacción para regenerar el NAD en el sistema de reacción.

En la producción de cetona a partir de alcohol se ha descrito un procedimiento para compensar los problemas anteriores, en los que se usa la NADH deshidrogenasa para regenerar NAD por una reducción de oxígeno en forma molecular por la cadena de respiración de un microorganismo para producir agua (documento de patente 4), pero no se han descrito ejemplos existentes de microorganismos que tienen una actividad potenciada de las enzimas.

[Documento de patente 1] Patente japonesa abierta a consulta por el público N° H10-174593
 [Documento de patente 2] Patente japonesa abierta a consulta por el público N° H10-174594
 [Documento de patente 3] Publicación internacional N° WO 2005/106005
 [Documento de patente 4] Patente japonesa abierta a consulta por el público N° 2005-218349
 [Documento de no patente 1] *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 65(10), pp. 2265-2270, (2001)

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0006] Un procedimiento de síntesis química no es suficientemente bueno desde el punto de vista de la pureza de los ácidos hidroxicarboxílicos que se van a obtener, y el bioprocedimiento convencional tiene el problema de la eliminación de cepas al usar una gran cantidad de células microbianas en la reacción de producción.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento industrialmente ventajoso para producir ácido glicólico, por el cual se pueda producir de forma eficaz el ácido glicólico usando una pequeña cantidad de células microbianas, usando un microorganismo *E. coli*.

[0007] A partir de los resultados de estudios para resolver los objetos anteriores, los autores de la presente invención han encontrado que se puede producir de forma eficaz ácido glicólico a partir de etilenglicol usando un microorganismo *E. coli* en el que se potencie la capacidad para regenerar dinucleótido de nicotinamida y adenina de tipo oxidado.

Es decir, la presente invención es como se describe en [1] a [4] a continuación en el presente documento.

[0008]
 [1] Un procedimiento para producir ácido glicólico a partir de etilenglicol usando NADH deshidrogenasa de *E. coli* que se puede obtener introduciendo un gen codificante.

[2] El procedimiento de producción como se expone en [1], en el que la *E. coli* tiene una actividad potenciada de al menos una enzima de lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa, y la *E. coli* se puede obtener introduciendo en *E. coli* un gen que codifica al menos una enzima de fucO y aldA de la lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa.

[3] El procedimiento de producción expuesto en [1], en el que la *E. coli* tiene una actividad de glicolato oxidasa inactivada o menor que la actividad de *E. coli* existente, que se puede obtener por alteración del gen *glcDEF* que

codifica la glicolato oxidasa.

[0009] [4] Una *E. coli* que tiene una actividad potenciada de al menos una enzima de lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa, y la *E. coli* se puede obtener introduciendo en *E. coli* un gen que codifica al menos una
5 enzima de fucO y aldA de la lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa, una actividad potenciada de la NADH deshidrogenasa y una actividad de glicolato oxidasa inactivada o menor que la actividad de *E. coli* existente, que se puede obtener por alteración del gen glcDEF que codifica la glicolato oxidasa.

[0010] Como se describe en el presente documento, los ácidos hidroxicarboxílicos se pueden producir eficazmente
10 usando una pequeña cantidad de células microbianas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011] Los objetos anteriores y otros objetos, características y ventajas estarán más claras con referencia a los
15 mejores modos de llevar a cabo la invención y las figuras descritas en lo sucesivo.

[0012] [Fig. 1] Es una gráfica que muestra el cambio a lo largo del tiempo de la relación NADH/NAD (contenido de NADH/contenido de NAD) en la célula en el ejemplo de referencia 1:

20 en la figura indica la relación de NADH/NAD de la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA-ndh;
O en la figura indica la relación de NADH/NAD de la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

25 **[0013]** La presente invención se describirá con más detalle a continuación.

[0014] La presente realización se refiere a un procedimiento para producir ácido glicólico. Este procedimiento es un procedimiento para producir un ácido glicólico a partir de etilenglicol usando *E. coli*, que se puede obtener introduciendo un gen que codifica la NADH deshidrogenasa.
30

En la presente realización, el etilenglicol se prepara a partir de ácido glicólico.

[0015] Aquí, la NADH deshidrogenasa se clasifica con el número de enzima 1.6.5.3, 1.6.99.3 o 1.6.99.5, basándose en la publicación de la Comisión de enzimas de la Unión internacional de Bioquímica (I.U.B.) y se refiere
35 a un nombre genérico de una enzima que cataliza reversiblemente una reacción para generar NAD a partir de NADH usando quinonas tales como ubiquinona, dimetilmenaquinona, menaquinona y similares como aceptor de electrones. Se prefiere la NADH deshidrogenasa que se clasifica con el número de enzima 1.6.99.3, basándose en la publicación de la Comisión de enzimas de la Unión internacional de Bioquímica (I.U.B.). Se puede ilustrar en *Escherichia coli* por la NADH deshidrogenasa codificada por el gen ndh que se describe por el número de acceso en
40 GenBank V00306.

[0016] La potenciación de la actividad de la NADH deshidrogenasa preferiblemente significa que la actividad es potenciada en 2 veces o más comparado con la de antes de la potenciación. Los microorganismos en los que se potencia la actividad enzimática se pueden producir, por ejemplo, usando un procedimiento de introducción de un
45 gen que codifica la enzima en un microorganismo sin manipulación genética (o un microorganismo antes de la recombinación) de acuerdo con una técnica de recombinación génica, un procedimiento de introducción de una mutación en un promotor de un gen que codifica la enzima en el genoma, y similares. Como procedimiento para introducir el gen en el microorganismo sin manipulación genética (o un microorganismo antes de la recombinación), se puede mencionar un procedimiento de introducción del gen en el microorganismo en forma de plásmido. La
50 preparación del ADN genómico usado para introducir un gen en un microorganismo, preparación de plásmido, escisión y ligado de ADN, transformación, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), diseño y síntesis del oligonucleótido usado como cebador y similares, se pueden llevar a cabo de acuerdo con procedimientos habituales bien conocidos para el experto en la materia. Estos procedimientos se han descrito en Sambrook, J., y col., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), y
55 similares.

[0017] Además, la *E. coli* relacionada con la presente realización tiene actividad potenciada de al menos una enzima de lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa, y la *E. coli* se puede obtener introduciendo un gen que codifica al menos una enzima de fucO y aldA de la lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa.

5

[0018] Aquí, la lactaldehído reductasa se clasifica con el número de enzima 1.1.1.77, basándose en el informe de la Comisión de enzimas de la I.U.B., y se refiere a un nombre genérico de una enzima que cataliza reversiblemente una reacción para producir lactaldehído a partir de 1,2-propanodiol en presencia de NAD, que es una coenzima.

10 **[0019]** Además, la lactaldehído deshidrogenasa se clasifica con el número de enzima 1.2.1.22, basándose en el informe de la Comisión de enzimas de la I.U.B., y se refiere a un nombre genérico de una enzima que cataliza una reacción para producir ácido láctico a partir de lactaldehído en presencia de NAD, que es una coenzima, y también la lactaldehído deshidrogenasa se clasifica con el número de enzima 1.2.1.21, basándose en el informe de la Comisión de enzimas de la I.U.B., y se refiere a un nombre genérico de una enzima glicolaldehído deshidrogenasa
15 que cataliza una reacción para producir ácido glicólico a partir de glicolaldehído en presencia de NAD, que es una coenzima. Esto es porque se ha descrito en la bibliografía previa que usa *Escherichia coli*, que la lactaldehído deshidrogenasa y la glicolaldehído deshidroegenasa son la misma enzima (Caballero, E., y col., *J. Biol. Chem.*, Vol. 258, pp. 7788-7792 (1983).

20 **[0020]** Además, potenciar la actividad de al menos una enzima de la lactaldehído reductasa y la lactaldehído deshidrogenasa significa que, por ejemplo, en *Escherichia coli* la actividad de al menos una enzima de estas enzimas se potencia preferiblemente en 20 veces o más, más preferiblemente en 100 veces o más, en comparación con una cepa sin manipulación genética (o un microorganismo antes de recombinación).

25 **[0021]** Estos microorganismos que tienen actividad potenciada de la enzima se pueden producir, por ejemplo, usando un procedimiento de introducción de un gen que codifica la enzima en un microorganismo sin manipulación genética (o un microorganismo antes de la recombinación) con una técnica de recombinación génica, un procedimiento de introducción de una mutación en un promotor de un gen que codifica la enzima en el genoma, o similares. Como procedimiento para introducir el gen en el microorganismo sin manipulación genética (o un
30 microorganismo antes de la recombinación), se puede mencionar un procedimiento para introducir el gen en el microorganismo en forma de plásmido. La preparación del ADN genómico usado para introducir un gen en un microorganismo, preparación del plásmido, escisión y ligado de ADN, transformación, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), diseño y síntesis del oligonucleótido usado como cebador y similares, se pueden llevar a cabo de acuerdo con un procedimiento habitual bien conocido para el experto en la materia. Estos procedimientos se han
35 descrito en la bibliografía mencionada antes de Sambrook, J., y col.

[0022] La *Escherichia coli* que tiene la actividad enzimática potenciada de la lactaldehído reductasa y la lactaldehído deshidrogenasa, se puede preparar como se describe a continuación.

40 **[0023]** La secuencia de bases del gen (en lo sucesivo se puede abreviar como fucO) de la lactaldehído reductasa de *Escherichia coli* ya se ha descrito (número de acceso en GenBank M31059). Además, la secuencia de bases del gen (en lo sucesivo se puede abreviar como aldA) de la lactaldehído deshidrogenasa de *Escherichia coli* también se ha descrito ya (número de acceso en GenBank M64541).

45 **[0024]** Con el fin de conseguir fucO, se usó un oligonucleótido como cebador para una amplificación por PCR usando el ADN genómico de *Escherichia coli* como molde, y el fragmento de ADN obtenido se digirió con una enzima de restricción para obtener un fragmento fucO.

[0025] Además, con el fin de obtener aldA, se usó un oligonucleótido como cebador para una amplificación por
50 PCR usando el ADN genómico de *Escherichia coli* como molde, y el fragmento de ADN obtenido se digirió con una enzima de restricción para obtener un fragmento de aldA.

[0026] Además, con el fin de obtener un promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se usó un oligonucleótido como cebador para una amplificación por PCR usando el ADN genómico de *Escherichia coli*
55 como molde, y el fragmento de ADN obtenido se digirió con una enzima de restricción para obtener un fragmento de

ADN que codifica un promotor de GAPDH.

- [0027]** Los 3 fragmentos de ADN anteriores se ligan con un fragmento obtenido por digestión de un plásmido con enzimas de restricción y después se transforman en *Escherichia coli* para obtener un transformante que crece en una placa de agar LB. La colonia obtenida se cultiva en un medio de cultivo líquido LB y se recupera el plásmido de las células microbianas obtenidas. Mediante introducción del plásmido en cualquier *Escherichia coli* hospedante, se puede preparar la *Escherichia coli* que tiene actividad enzimática potenciada de lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa.
- 10 **[0028]** En los microorganismos relacionados con la presente realización, la actividad de la glicolato oxidasa está inactivada o reducida comparada con la de microorganismos existentes.
- [0029]** Aquí, la glicolato oxidasa se clasifica con el número enzimático 1.1.3.15, basándose en el informe de la Comisión de enzimas de la I.U.B., y se refiere a un nombre genérico de una enzima que cataliza reversiblemente una reacción para producir ácido glioxílico a partir de ácido glicólico.
- 15 **[0030]** La inactivación de la actividad de la glicolato oxidasa significa una pérdida completa de actividad de la enzima. Además, la disminución de la actividad de la glicolato oxidasa significa que la actividad de la enzima se pierde parcialmente, preferiblemente la mitad o menos, preferiblemente una décima parte o menos, con respecto a la actividad de la glicolato oxidasa de una cepa sin manipulación genética (o un microorganismo antes de la recombinación). Con el fin de inactivar o disminuir la actividad de la glicolato oxidasa, hay procedimientos tales como introducir una mutación en el gen que codifica la proteína, o eliminar o sustituir el gen, o añadir un medicamento que inactiva específicamente la proteína, irradiar con rayos ultravioleta o similares. La mutación, eliminación y sustitución del gen diana se puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos comunes conocidos para un experto en la materia. Específicamente, se puede mencionar una cepa de *Escherichia coli* MT-11023 como un microorganismo en el que la actividad de la glicolato oxidasa está inactivada por alteración del gen *glcDEF* que codifica la glicolato oxidasa.
- 20 **[0031]** Puesto que la actividad de la glicolato oxidasa en la cepa de *Escherichia coli* MT-11023 es inactivada por una alteración génica, se puede llevar a cabo la presente invención usando la cepa. La presente cepa se ha depositado con el número de depósito FERM BP-10293 desde el 10 de marzo de 2005 en el Centro depositario de organismos para patentes internacionales del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada de Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón, basado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes.
- 35 **[0032]** En la presente invención, la expresión "en forma de plásmido" cuando se introduce un gen que codifica una determinada enzima diana en un microorganismo, se refiere a un caso en el que se prepara un plásmido recombinante ligando el gen a un vector y el plásmido preparado se introduce en el microorganismo por transformación o similar. También, cuando un gen objetivo se liga funcionalmente a un promotor fuerte que funciona constitutivamente en un microorganismo, se puede lograr el objetivo de la presente invención usando un plásmido en el que se sabe que en general el número de copias por célula del microorganismo es pequeño debido a una propiedad del replicón en un plásmido. Como plásmido que tiene dicho replicón, se puede ilustrar pACYC184 (número de acceso en GenBank: X06403).
- 40 **[0033]** Cuando se lleva a cabo el procedimiento de producción de la presente realización, la cantidad de células microbianas de microorganismo necesarias se obtiene normalmente cultivando y haciendo crecer un microorganismo usando un medio de cultivo.
- 45 En la presente invención, el medio de cultivo para usar para el cultivo no está particularmente limitado, siempre que contenga una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, ion inorgánico y opcionalmente cantidades en trazas de otros componentes orgánicos. Como fuente de carbono se usan adecuadamente sacáridos tales como glucosa, fructosa, molasas y similares; ácidos orgánicos tales como ácido fumárico, ácido cítrico, ácido succínico y similares; y alcoholes tales como metanol, etanol, glicerol y otros. Como fuente de nitrógeno, se usan adecuadamente fuentes de nitrógeno inorgánicas y orgánicas tales como sales de amonio orgánicas, sales de amonio inorgánicas, amoniaco
- 50
- 55

gaseoso, agua con amoniaco, hidrolisatos de proteínas y otros. Como iones inorgánicos se usan adecuadamente según se requiera ion magnesio, ion fosfato, ion potasio, ion hierro, ion manganeso, ion sulfato, y otros. Como componentes orgánicos en cantidades en trazas, se usan adecuadamente vitaminas, aminoácidos y similares y extracto de levaduras que contienen vitaminas, aminoácidos y similares, peptona, líquido de maceración de maíz, 5 hidrolisato de caseína y otros.

[0034] Como medio de cultivo para usar para el cultivo, se prefiere un medio de cultivo líquido considerando que se proporciona un microorganismo para la producción industrial. Además, se prefiere que una composición del medio de cultivo sea polipeptona de 0,5 g/l a 10 g/l, Fe_2SO_4 de 0,02 g/l a 0,3 g/l, K_2HPO_4 de 0,5 g/l a 5 g/l, KH_2PO_4 10 de 0,5 g/l a 5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 0,5 g/l a 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,3 g/l a 15 g/l, ácido nicotínico de 0,02 g/l a 1 g/l (un disolvente es el agua).

[0035] Cuando se cultivan los microorganismos relacionados con la presente realización, las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas, y el cultivo se lleva a cabo controlando de forma adecuada el pH y la 15 temperatura. Se pueden usar condiciones aerobias o anaerobias, pero preferiblemente se pueden usar condiciones aerobias. La velocidad de aireación es preferiblemente de 0,2 l/min a 3 l/min para el medio de cultivo de 1 litro, y más preferiblemente de 0,5 l/min a 2 l/min. Además, la velocidad de agitación preferiblemente es de 200 rpm a 1000 rpm y mas preferiblemente de 500 rpm a 800 rpm. Haciendo lo descrito anteriormente, se puede obtener una célula microbiana para dar una gran cantidad de producción de ácido hidroxicarboxílico por peso de células microbianas. 20 Además, el cultivo se puede llevar a cabo usando una columna de burbujeo de gas o similar, que puede garantizar un suministro de oxígeno disuelto correspondiente a las condiciones anteriores de velocidad de aireación y velocidad de agitación.

El pH preferido es de 5 a 8, más preferido es el pH de 7,0 a 7,4, y lo más preferido es el pH de 7,2. Haciendo esto, 25 se puede obtener una célula microbiana que produce una gran cantidad de ácido hidroxicarboxílico por peso de células microbianas.

Además, la temperatura preferiblemente es de 25°C a 40°C, más preferiblemente de 33°C a 37°C, y lo más preferiblemente de 35°C. Haciendo esto, se puede obtener una célula microbiana que produce una gran cantidad de 30 ácido hidroxicarboxílico por peso de células microbianas.

El tiempo necesario para el cultivo es de 12 h a 50 h. Haciendo esto, se puede obtener una célula microbiana que produce una gran cantidad de ácido hidroxicarboxílico por peso de células microbianas.

35 **[0036]** El disolvente usado en la producción de los ácidos hidroxicarboxílicos se puede ilustrar por disoluciones tampón tales como disolución tampón de fosfato potásico, el medio de cultivo mencionado antes para el cultivo de un microorganismo, y agua pura. Además, la reacción se puede llevar a cabo poniendo en contacto células microbianas de microorganismos obtenidas del cultivo previo con un líquido mezcla del alcohol polihídrico alifático de la materia prima y un disolvente. Para las células microbianas de microorganismos, se puede ilustrar un 40 procedimiento que usa el propio caldo de cultivo después de terminar el cultivo o un procedimiento que usa solo las células microbianas recuperadas del caldo de cultivo.

[0037] En la reacción en el procedimiento de producción de la presente invención, las condiciones de reacción no están particularmente limitadas y la reacción se lleva a cabo mientras se controla adecuadamente el pH y la 45 temperatura. Por ejemplo, preferiblemente el pH es de 6 a 9, más preferiblemente de 7,0 a 8,0, y lo más preferiblemente 7,2. Haciendo esto, se puede obtener un efecto de aumento de la cantidad de producción de ácido glicólico por una cantidad de células microbianas añadidas a la disolución de la reacción.

Además, la temperatura está preferiblemente en el intervalo de 20°C a 45°C, más preferiblemente de 30°C a 40°C, y 50 lo más preferiblemente es 35°C. Haciendo esto, se puede obtener un efecto de aumento de la cantidad de producción de ácido glicólico por una cantidad de células microbianas añadidas a la disolución de la reacción.

La reacción también se puede llevar a cabo preferiblemente en unas condiciones aerobias. La velocidad de aireación es preferiblemente de 0,1 l/min a 2,0 l/min por 1 litro de disolución de reacción, y preferiblemente de 0,2 55 l/min a 1,0 l/min. Además la velocidad de agitación es preferiblemente de 200 rpm a 1000 rpm y más preferiblemente

de 400 rpm a 800 rpm. Haciendo esto, se puede obtener un efecto de aumento de la cantidad de producción de ácido glicólico por una cantidad de células microbianas añadidas a la disolución de la reacción. Además, la reacción se puede llevar a cabo usando una columna de burbujeo de gas o similar, que puede garantizar un suministro de oxígeno disuelto correspondiente a las condiciones de velocidad de aireación y velocidad de agitación descritas
5 antes.

Además, el tiempo de reacción se ajusta para que sea de 12 h a 96 h, de modo que el ácido glicólico se puede obtener con una tasa de rendimiento de 80% o más.

- 10 **[0038]** El procedimiento para recuperar un ácido hidroxicarboxílico acumulado en la disolución de la reacción obtenida como se ha descrito antes, no está particularmente limitado. Sin embargo, se puede adoptar por ejemplo, un procedimiento que incluya separar las células microbianas de la disolución de la reacción por centrifugación o similar, y después usando una resina adsorbente sintética, un procedimiento que usa un precipitado, un
15 procedimiento para separar un ácido hidroxicarboxílico de acuerdo con otros procedimientos de recolección y separación habituales.

EJEMPLOS

EJEMPLO DE PRODUCCIÓN 1 Construcción de la cepa de *Escherichia coli* MG1655glcDEF-eliminado

20

[0039] La secuencia de bases entera del ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* ya se ha descrito (número de acceso en GenBank U00096), y también se ha descrito la secuencia de bases de un gen (en lo sucesivo se puede denominar glcDEF) de la glicolato oxidasa de *Escherichia coli* (número de acceso de GenBank L43490).

- 25 **[0040]** Se usaron los oligonucleótidos representados por la secuencia nº 1 (TTGGTACCGTTCTGCCAGCAACTGACG) y secuencia nº 2 (TGTCTAGACTACCTCTGTGCGTCACTGG), y secuencia nº 3 (GCTCTAGACGCTTTGTTGTGTTGTGTTGG) y secuencia nº 4 (AACTGCAGGATCGGTCAATGATTGCAGC), construidos basándose en la información génica del dominio cerca de glcDEF del ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655, para una amplificación por PCR. El fragmento de
30 ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción KpnI y XbaI, y XbaI y PstI, respectivamente, para obtener fragmentos de aproximadamente 670 pb y 790 pb, respectivamente. Estos fragmentos de ADN se mezclaron con un fragmento obtenido por digestión de un vector de clonación sensible a la temperatura pTH18cs1 (número de acceso en GenBank AB019610) (Hashimoto-Gotoh, T., *Gene*, 241, 185-191 (2000)) con KpnI y PstI, se ligaron usando una ligasa y después se transformaron en una cepa de *Escherichia coli* DH5 α (producida por Toyobo Co., Ltd.) a 30°C,
35 para obtener un transformante que crece en una placa de agar LB que contiene 10 μ g/ml de cloranfenicol. La colonia obtenida se cultivó en un medio de cultivo líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol a 30°C durante la noche, y se recuperó un plásmido de las células microbianas obtenidas.

- [0041]** Este plásmido se transformó en una cepa de *Escherichia coli* MG1655 a 30°C, y se cultivó en una placa de
40 agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol a 30°C durante la noche, para obtener un transformante. El transformante obtenido se inoculó en un medio de cultivo líquido LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol y se cultivó a 30°C durante la noche. Después, con el fin de obtener las células microbianas cultivadas de los mismos, el transformante cultivado se aplicó sobre una placa de agar LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol para obtener colonias que crecían a 42°C. Las colonias obtenidas se cultivaron en un medio de cultivo líquido LB que no contenía
45 medicamentos, a 30°C durante la noche, y se aplicaron de nuevo sobre una placa de agar LB que no contenía medicamentos para obtener colonias que crecían a 42°C.

- [0042]** A partir de las colonias desarrolladas, se escogieron aleatoriamente 100 colonias, y se hizo crecer cada una de ellas en una placa de agar LB que no contenía un antibiótico y una placa de agar LB que contenía 10 μ l/ml de cloranfenicol, para seleccionar los clones sensibles al cloranfenicol que crecían solo en la placa de agar LB que no contenía antibiótico. Además, se amplificó un fragmento de aproximadamente 3,8 kpb que contenía glcDEF por PCR usando el ADN cromosómico de estos clones deseados, para seleccionar una cepa en la que se hubiera eliminado el dominio glcDEF, y la cepa obtenida se denominó cepa MG1655glcDEF-eliminado (en lo sucesivo se puede denominar simplemente Δ glcDEF). Además, *Escherichia coli* MG1655 se puede obtener de la American Type
55 Culture Collection.

EJEMPLO DE PRODUCCIÓN 2 Construcción del vector de expresión doble de lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa

- 5 **[0043]** La secuencia de bases de un gen (en lo sucesivo se puede abreviar como fucO) de lactaldehído reductasa de *Escherichia coli* ya se ha descrito (número de acceso en GenBank M31059). Además, la secuencia de bases de un gen (en lo sucesivo se puede abreviar aldA) de la lactaldehído deshidrogenasa de *Escherichia coli* también se ha descrito (número de acceso en GenBank M64541).
- 10 **[0044]** Con el fin de obtener fucO, se usaron los oligonucleótidos representados por la secuencia nº 5 (GCTCTAGACGGAGAAAAGTCTTATGATGGCTAACAGAATGATCCTG) y la secuencia nº 6 (GTGAAGCTTGCATTTACCAGGCGGTATGG) para una amplificación por PCR usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde, y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción XbaI y HindIII para dar un fragmento fucO de aproximadamente 1,2 kpb. Además, con el fin de obtener aldA, se usaron los oligonucleótidos representados por la secuencia nº 7 (CGAATTCCGGAGAAAAGTCTTATGTCAGTACCCGTTCAACATCC) y la secuencia nº 8 (GCTCTAGACTCTTTCATCATTAAAGACTG) para una amplificación por PCR usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde, y el fragmento de ADN obtenido se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI para dar un fragmento aldA de aproximadamente 1,5 kpb.
- 20 Además, con el fin de obtener un promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se usaron los oligonucleótidos representados por la secuencia nº 9 (AACGAATTCTCGCAATGATTGACACGATTC) y la secuencia nº 10 (ACAGAATTTCGCTATTTGTTAGTGAATAAAAAGG) para una amplificación por PCR usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde, y el fragmento de ADN obtenido se digirió con una enzima de restricción EcoRI para dar un fragmento de ADN de aproximadamente 100 pb que codifica un promotor de GAPDH.
- 25

- [0045]** Los 3 fragmentos de ADN mencionados antes, se mezclaron con el fragmento obtenido por digestión del plásmido pUC18 (producido por Toyobo Co., Ltd.) con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, se ligaron usando una ligasa, y después de transformaron en una cepa de *Escherichia coli* DH5 α (producida por Toyobo Co., Ltd.), para obtener un transformante que crece en una placa de agar LB que contiene 50 μ g/ml de ampicilina. La colonia obtenida se cultivó en un medio de cultivo líquido LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina a 37°C durante la noche. Se recuperó un plásmido de las células microbianas así obtenidas y el plásmido se denominó pGAPfucO-aldA.
- 30

EJEMPLO DE PRODUCCIÓN 3. Construcción del transformante de la cepa Δ glcDEF por el vector de expresión doble de la lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa

35

- [0046]** El plásmido pGAPfucO-aldA obtenido en el ejemplo de producción 2 se transformó en la cepa Δ glcDEF obtenida en el ejemplo de producción 1, y se cultivó en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina a 37°C durante la noche, para obtener la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA.
- 40

EJEMPLO 1. Construcción del vector de expresión triple de lactaldehído reductasa, lactaldehído deshidrogenasa y NADH deshidrogenasa y construcción del transformante de la cepa Δ glcDEF por el vector

- [0047]** La secuencia de bases de un gen (en lo sucesivo se puede abreviar ndh) de la NADH deshidrogenasa de *Escherichia coli* ya se ha descrito (número de acceso en GenBank V00306). Con el fin de obtener ndh, se usaron los oligonucleótidos representados por la secuencia nº 11 (CGAATTCCGGAGAAAAGTCTTATGACTACGGCATTGAAAAAGATTGTG) y la secuencia nº 12 (GGTCTAGACGATTAATGCAACTTCAAACG) para una amplificación por PCR usando el ADN genómico de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 como molde, para obtener un fragmento de ndh de aproximadamente 1,3 kpb. El fragmento de ndh obtenido se trató con la T4 ADN polinucleótido quinasa.
- 45
- 50

- [0048]** Este fragmento de ADN se mezcló con un fragmento obtenido por el plásmido pGAPfucO-aldA construido en el ejemplo de producción 2, se digirió con HindIII y después se sometió a un tratamiento de extremo romo y un tratamiento de desfosforilación, se ligó usando una ligasa y se transformó en la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (producida por Toyobo Co., Ltd.), para obtener un transformante que crecía en una placa de agar LB que contiene
- 55

50 µg/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron en un medio de cultivo líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina a 37°C durante la noche, y se recuperó un plásmido de las células microbianas obtenidas, y el plásmido obtenido se denominó pGAPfucO-aldA-ndh. El plásmido obtenido pGAPfucO-aldA-ndh se transformó en la cepa ΔglcDEF obtenida en el ejemplo de producción 1 y se cultivó en una placa de agar LB que contenía 50 µg/l de ampicilina a 37°C durante la noche, para obtener la cepa ΔglcDEF/pGAPfucO-aldA-ndh.

EJEMPLO 2: Producción de ácido glicólico por la cepa ΔglcDEF/pGAPfucO-aldA-ndh

[0049] La cepa ΔglcDEF/pGAPfucO-aldA obtenida en el ejemplo 1 se inoculó en 25 ml de caldo LB, caldo de cultivo Miller (Difco244620) como medio de cultivo contenido en un matraz Erlenmeyer, y se cultivó durante la noche con agitación a 120 rpm a una temperatura de cultivo de 35°C, como precultivo. Después, se transfirió toda la cantidad del caldo de precultivo a un fermentador de 1 litro (BMJ-01, aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation) que contenía 475 g de medio de cultivo de la composición mostrada a continuación para llevar a cabo el cultivo. El cultivo se llevó a cabo en condiciones de presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,5 l/min, una velocidad de agitación de 800 rpm, una temperatura de cultivo de 35°C y pH 7,2 (ajustado con una disolución acuosa de NH₃). Después de agotarse completamente la glucosa inicial en las condiciones anteriores, se suministró un total de 40 g de glucosa a una velocidad variable para dar una concentración de glucosa de menos de 0,1 g/l en el medio de cultivo para el tiempo restante.

20 Composición del medio de cultivo

[0050]

Polipeptona 7 g/l
 Glucosa: 30 g/l
 25 Ácido nicotínico: 0,1 g/l
 Fe₂SO₄: 0,09 g/l
 K₂HPO₄: 2 g/l
 KH₂PO₄: 2 g/l
 MgSO₄·7H₂O: 2 g/l
 30 (NH₄)₂SO₄: 5 g/l
 Disolvente: agua

[0051] Las células microbianas a las 24 h después de iniciar el cultivo se recogieron por centrifugación (8.000 rpm durante 20 min). Se pesaron 4,5 g de las células microbianas húmedas después de la recolección de las células microbianas y después se suspendieron en agua destilada junto con 65 g de etilenglicol para obtener 500 ml de cantidad final de líquido. La suspensión se transfirió a un fermentador de un aparato de cultivo BMJ-01 fabricado por ABLE Corporation, para llevar a cabo la reacción durante 70 h. La reacción se llevó a cabo en condiciones que incluían presión atmosférica, una velocidad de aireación de 0,25 l/min, una velocidad de agitación de 550 rpm, una temperatura de cultivo de 35°C y pH 7,2 (ajustado con una disolución acuosa de NH₃). Se cuantificó la cantidad de ácido glicólico acumulado en la disolución de la reacción obtenida, usando cromatografía líquida de alta velocidad producida por Hitachi Ltd., en las condiciones descritas a continuación:

[0052]

Columna: ULTRON PS-80 H (producida por Shinwa Chemical Industries Ltd.)
 45 Disolución eluida: disolución acuosa de ácido perclórico (pH 2,1)
 Caudal: 1,0 ml/min
 Detector: detector UV
 Longitud de onda para la medición: 280 nm

50 **[0053]** Además, se obtuvo el peso de las células microbianas secas de las células microbianas usadas en la reacción a partir del peso seco después de secar una parte de las células microbianas húmedas a 50°C. Con la cepa ΔglcDEF/pGAPfucO-aldA-ndh, se produjeron 39,8 g de ácido glicólico por 1 g de las células microbianas secas.

[0054] Además, la velocidad de crecimiento de la cepa ΔglcDEF/pGAPfucO-aldA-ndh era la misma que la de la cepa ΔglcDEF/pGAPfucO-aldA en el ejemplo comparativo 1, y se confirmó que no se producía el retraso de

crecimiento potenciando el gen nad.

EJEMPLO COMPARATIVO 1. Producción de ácido glicólico por la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA

- 5 **[0055]** Para la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA obtenida en el ejemplo de producción 3, el cultivo y la producción de ácido glicólico se llevaron a cabo de la misma forma que en el ejemplo 2. La cantidad de ácido glicólico producido era 20,2 g por 1 g de células microbianas secas de la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-ald.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1. Medición del contenido intracelular del dinucleótido de nicotinamida y adenina en la
10 cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA-ndh y en la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA

[0056] Para la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA-ndh y la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA, el cultivo y la producción de ácido glicólico se llevaron a cabo de la misma forma que en el ejemplo 2.

- 15 **[0057]** Para cada una de las cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA-ndh y la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA que producían ácido glicólico, se llevaron a cabo tomas de muestra de 1 ml a determinados intervalos y se pusieron en dos tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 4°C para recoger las células microbianas. Usando uno de los dos tubos de microcentrífuga para una medición de NAD y el otro para una medición de NADH, se llevaron a cabo respectivamente los tratamientos descritos a continuación.

20

- [0058]** La muestra para la medición de NAD se suspendió por adición de 400 μ l de disolución acuosa de ácido clorhídrico 0,04 mol/l por 1,5 mg de las células microbianas húmedas recogidas. La suspensión se calentó a 90°C durante 3 min y después se enfrió rápidamente en un baño de hielo. Usando el líquido sobrenadante de este líquido tratado, se preparó la disolución de reacción de la composición descrita a continuación. Aquí, se usó Tris-HCl 1 mol/l de pH 9,0. Además, como alcohol deshidrogenasa se usó una alcohol deshidrogenasa (A3263) producida por Sigma
25 Chemical Co., disolviéndola con Tris-HCl 10 mmol/l (pH 8,8) para preparar 400 unidades/ml (siempre que 1 unidad sea una cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μ mol de etanol en acetaldehído en condiciones de pH 8,8 y 25°C durante 1 min). Se midió la absorción a 450 nm de la disolución de reacción de acuerdo con el protocolo de Tetra Color ONE (producido por SEIKAGAKU CORPORATION). Además, una disolución de NAD producida por
30 Sigma Chemical Company se sometió al mismo tratamiento y medición para obtener una curva de calibración y se obtuvo la concentración de NAD en la muestra.

- [0059]** La muestra para la medición de NADH se suspendió por adición de 400 μ l de disolución acuosa de hidróxido potásico 0,04 mol/l por 1,5 mg de las células microbianas húmedas recogidas. La suspensión se calentó a
35 90°C durante 3 min y después se enfrió rápidamente en un baño de hielo. Usando el líquido sobrenadante de este líquido tratado, se preparó la disolución de reacción de la composición descrita a continuación. Aquí, se usó Tris-HCl 1 mol/l de pH 8,8. Además, como alcohol deshidrogenasa se usó una alcohol deshidrogenasa (A3263) producida por Sigma Chemical Co., disolviéndola con Tris-HCl 10 mmol/l (pH 8,8) para preparar 400 unidades/ml (siempre que 1
40 unidad sea una cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μ mol de etanol en acetaldehído en condiciones de pH 8,8 y 25°C durante 1 min).

- [0060]** Se midió la absorción a 450 nm de la disolución de reacción de acuerdo con el protocolo de Tetra Color ONE (producido por SEIKAGAKU CORPORATION). Además, una disolución de NADH producida por Sigma
45 Chemical Company se sometió al mismo tratamiento y medición para obtener una curva de calibración y se obtuvo la concentración de NADH en la muestra. En la figura 1 se indica la relación de NADH/NAD (contenido de NADH/contenido de NAD) en este momento. El eje horizontal indica el tiempo de reacción (h) y el eje vertical indica la relación de NADH/NAD (contenido de NADH/contenido de NAD). Se observó que el valor de la relación de NADH/NAD era siempre pequeño y que el NAD se regeneraba a partir del NADH en la cepa Δ glcDEF/pGAPfucO-aldA-ndh.

50

Composición de la disolución de reacción

[0061]

Líquido sobrenadante: 25 μ l

- 55 Tris-HCl de 1 mol/l: 25 μ l

Etanol al 25%: 10 μ l

Agua pura: 20 μ l

Tetra Color ONE (producido por SEIKAGAKU CORPORATION): 10 μ l

Alcohol deshidrogenasa: 10 μ l

5

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

[0062] El presente procedimiento y el microorganismo E. coli de la presente invención se pueden usar para producir ácido glicólico útil como materia prima para polímeros o compuestos intermedios para medicamentos.

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir ácido glicólico a partir de etilenglicol usando *Escherichia coli* que tiene una actividad de NADH deshidrogenasa potenciada, en el que la *Escherichia coli* se puede obtener introduciendo en
5 *Escherichia coli* un gen que codifica la NADH deshidrogenasa.
2. El procedimiento de producción expuesto en la reivindicación 1, en el que la *Escherichia coli* tiene una actividad potenciada de al menos una enzima de lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa, en el que la *Escherichia coli* que tiene actividad potenciada se puede obtener introduciendo en *Escherichia coli* un gen que
10 codifica al menos una enzima de fucO y aldA de la lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa.
3. El procedimiento de producción expuesto en la reivindicación 1, en el que la *Escherichia coli* tiene una actividad de la glicolato oxidasa inactivada o menor que la actividad de *Escherichia coli* existente, en el que la *Escherichia coli* que tiene actividad inactivada o menor se puede obtener por alteración del gen glcDEF que codifica
15 la glicolato oxidasa.
4. Una *Escherichia coli* que tiene (i) al menos una actividad enzimática potenciada de la lactaldehído reductasa y la lactaldehído deshidrogenasa, en la que la *Escherichia coli* que tiene la actividad potenciada se puede obtener introduciendo en *Escherichia coli* un gen que codifica al menos una enzima de fucO y aldA de la
20 lactaldehído reductasa y lactaldehído deshidrogenasa; (ii) una actividad potenciada de la NADH deshidrogenasa; y (iii) una actividad de la glicolato oxidasa inactivada o reducida, en la que la *Escherichia coli* que tiene la actividad inactivada o reducida se puede obtener por alteración del gen glcDEF que codifica la glicolato oxidasa, en la que la *Escherichia coli* se puede obtener introduciendo en *Escherichia coli* un gen que codifica la NADH
25 deshidrogenasa.

Fig. 1

