

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 305**

51 Int. Cl.:

C12P 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008 E 08875291 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2346999**

54 Título: **Utilización de la sacarosa como sustrato para la producción fermentativa de 1,2-propanodiol**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2013

73 Titular/es:

**METABOLIC EXPLORER (100.0%)
Biopole Clermont-Limagne
63360 Beuzire, FR**

72 Inventor/es:

**VOELKER, FRANÇOIS;
FIGGE, RAINER y
SOUCAILLE, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 429 305 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

Utilización de la sacarosa como sustrato para la producción fermentativa de 1,2-propanodiol.

5 La presente invención se refiere a los procesos de fermentación. En particular, la presente invención se refiere a la producción de 1,2-propanodiol mediante fermentación, a partir de un medio que contiene sacarosa, en particular a partir de una biomasa vegetal, en la que el microorganismo se modifica genéticamente mediante la introducción de los genes serKYARBR o cscBKAR.

10 El 1,2-propanodiol o propilenglicol, un dialcohol C3, es un compuesto químico ampliamente utilizado. Es un componente de las resinas de poliéster insaturadas, los detergentes líquidos, los líquidos refrigerantes, los fluidos anticongelantes y antiescarcha para los aviones. El propilenglicol se ha estado utilizando cada vez más desde 1993-1994 como un sustituto de los derivados de etileno, que se han identificado por ser más tóxicos que los derivados de propileno.

15 El 1,2-propanodiol se produce actualmente mediante mecanismos químicos que utilizan un procedimiento de hidratación del óxido de propileno que consume grandes cantidades de agua. El óxido de propileno se puede producir mediante dos procedimientos, uno que utiliza epicloridrina, y el otro hidroperóxido. Ambas vías utilizan sustancias muy tóxicas. Además, la vía del hidroperóxido genera subproductos como el terc-butanol y el 1-fenil etanol. Para que la producción de propileno sea rentable, se ha de encontrar una utilización para estos subproductos. La vía química produce normalmente 1,2-propanodiol racémico, mientras que los dos estereoisómeros (R)1,2-propanodiol y (S)1,2-propanodiol resultan interesantes para determinadas aplicaciones (por ejemplo, materiales de partida quirales para especialidades químicas y productos farmacéuticos).

25 Antecedentes de la técnica

Las desventajas de los procedimientos químicos para la producción de 1,2-propanodiol hacen de la síntesis biológica una alternativa atractiva. Se han descrito dos vías para la producción natural de 1,2-propanodiol a partir de azúcares mediante microorganismos. En la primera vía, los 6-desoxiazúcares (por ejemplo, L-ramnosa o L-fucosa) se rompen en fosfato de dihidroxiacetona y (S)-lactaldehído, que se puede reducir aún más a (S)-1,2-propanodiol (Badia et al., 1985). Esta vía es funcional en *E. coli*, pero no puede producir un procedimiento económicamente viable debido al elevado coste de las desoxihexosas. La segunda vía es el metabolismo de los azúcares comunes (por ejemplo, glucosa o xilosa) mediante la vía de glicólisis seguida por la vía de metilglioxal. La dihidroxiacetona fosfato se convierte en metilglioxal que se puede reducir a lactaldehído o a acetol. Después, estos dos compuestos pueden someterse a una segunda reacción de reducción que produce 1,2-propanodiol. Esta vía se utiliza con productores naturales de (R)-1,2-propanodiol, como *Clostridium sphenoides* y *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*. Estos dos organismos se han utilizado para producir 1,2-propanodiol a partir de azúcares diferentes, específicamente monosacáridos (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa para las hexosas y D-xilosa o L-arabinosa para las pentosas) o disacáridos (lactosa o celobiosa) o sus mezclas (Tran Din and Gottschalk, 1985, Cameron and Cooney, 1986, Sanchez-Rivera et al., 1987 Altaras et al., 2001). El mejor rendimiento obtenido fue un título de 9 g/l y un rendimiento de 0,2 g/g de glucosa (Sanchez-Rivera et al., 1987). Sin embargo, es probable que la mejora de los rendimientos obtenidos con estos organismos sea limitada debido a la escasez de herramientas genéticas disponibles. La misma vía de síntesis es funcional en *E. coli* u otras enterobacterias y el grupo de Cameron ha realizado varias investigaciones (Cameron et al., 1998, Altaras and Cameron, 1999, Altaras and Cameron, 2000) y también el grupo de Bennett (Huang et al., 1999, Berrios-Rivera et al., 2003) sobre la producción de 1,2-propanodiol en estos organismos con fuentes de carbono limitadas a D-glucosa o D-fructosa. El mejor resultado obtenido en un fermentador alimentado por lotes fue una producción de 4,5 g/l de 1,2-propanodiol con un rendimiento de 0,19 g/g de glucosa (Altaras y Cameron, 2000). Los resultados obtenidos utilizando el mismo enfoque pero con títulos y rendimientos más bajos también se describen en la patente WO 98/37204, aunque utilizando diferentes fuentes de carbono, principalmente galactosa, lactosa, sacarosa y xilosa pero también glucosa. Los títulos obtenidos con disacáridos (lactosa y sacarosa) fueron muy bajos (6 mg/l y 7 mg/l respectivamente). En la solicitud de patente WO 2005/073364 se describieron mejores resultados de producción con una cepa de *E. coli* designada racionalmente y después evolucionada. Se obtuvo un título de 1,8 g/l, con un rendimiento de 0,35 g/g de glucosa consumida. En la patente WO 99/28481 también se ha descrito la producción de 1,2-propanodiol e hidroxiacetona utilizando levadura recombinante.

Las fuentes de carbono utilizadas en el medio de fermentación consisten generalmente en hidratos de carbono, principalmente derivados de plantas. La sacarosa se obtiene a partir de plantas de azúcar como la remolacha azucarera, la caña de azúcar, el sorgo dulce, el arce de azúcar o el agave azul. El almidón es el almacén de hidratos de carbono más abundante en las plantas. Las fuentes de almidón más importantes son los cereales (maíz, trigo, arroz), la yuca, los boniatos y las patatas. La mayoría de microorganismos no metabolizan el almidón pero se puede procesar en materias primas fermentables por la industria del almidón. Los polímeros de inulina o similares a la inulina (que consisten principalmente en unidades de fructosa) son el segundo almacén más abundante de hidratos de carbono en plantas y se encuentran en la endivia, el tupinambo o la dalia. La biomasa de lignocelulosa compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina también es una fuente de hidratos de carbono prometedora pero todavía en desarrollo (Peters, 2006). Puesto que los costes de los productos de los materiales químicos producidos

biotecnológicamente están principalmente relacionados con el coste de la materia prima (es decir, el coste del sustrato de fermentación), la utilización de azúcares refinados como la glucosa o la sacarosa no son una elección económicamente sostenible para una producción a escala industrial. Son necesarios sustratos menos caros que retengan un alto contenido de azúcar fermentable. En este aspecto, la sacarosa que contiene fuentes de carbono procedente de la industria azucarera representa una buena opción.

La sacarosa se produce a partir de la remolacha azucarera que contiene de 16 a 24% de sacarosa por remolacha azucarera y que se procesa en varias etapas. Las remolachas limpiadas y lavadas se cortan en trozos largos denominados cosetas (cosettes) que se extraen con agua caliente mediante difusión para obtener un zumo de sacarosa denominado zumo crudo que contiene entre un 10% y un 15% de sacarosa. La segunda etapa es la de purificación del zumo crudo mediante alcalinización o carbonatación que utiliza cal y después dióxido de carbono para extraer las impurezas y obtener el zumo fino. El proceso de evaporación incrementa la concentración de sacarosa en el zumo fino mediante la extracción de agua para mantener el zumo fino con un contenido de sacarosa de 50 a 65%. Después, este zumo concentrado de sacarosa se cristaliza y los cristales se separan mediante centrifugación y después se lavan y se secan para obtener azúcar puro. Se pueden aplicar una o más etapas de cristalización para obtener sacarosa de varios grados de pureza. Los subproductos de la remolacha azucarera incluyen la pulpa (las cosetas consumidas) y la melaza (el licor madre restante tras la cristalización que todavía presenta un contenido de sacarosa de 40 a 60%).

La sacarosa también se produce en la industria azucarera a partir de la caña de azúcar (entre un 7 y un 20% de contenido de sacarosa). La caña de azúcar cosechada se rompe y después se tritura y al mismo tiempo se extrae la sacarosa con agua para obtener el zumo crudo. La caña triturada consumida de azúcar se denomina bagazo. El residuo se utiliza principalmente como combustible para generar vapor procesado. Después, el zumo crudo se aclara añadiendo cal y calor y el zumo clarificado se separa del precipitado. Las últimas etapas del proceso, la evaporación para obtener un jarabe concentrado y la cristalización son esencialmente las mismas que en el caso del proceso de la remolacha azucarera. Los subproductos del procesamiento de la caña de azúcar incluyen el bagazo, la pasta húmeda del aclarado del zumo crudo y diferentes tipos de melazas, que todavía contienen una cantidad significativa de sacarosa.

La sacarosa diferente que contiene productos intermedios, productos o subproductos de los procesos del azúcar (zumo crudo, zumo fino o clarificado, zumo espeso, jarabe de sacarosa, sacarosa pura, melazas) puede servir como materia prima de fermentación. Por ejemplo, la industria azucarera en Brasil está utilizando el zumo clarificado de la caña de azúcar para la producción de etanol para utilizarlo como un sustituto de la gasolina. Los ejemplos recientes en la bibliografía que utilizan productos que contienen sacarosa cruda incluyen la producción de etanol a partir de la difusión de la remolacha azucarera mediante *Zymomonas mobilis* (Beckers et al., 1999), la producción de D-lactato a partir de melazas mediante *E. coli* (Shukla et al., 2004) y la producción de D-lactato a partir de melazas de caña de azúcar, zumo de caña de azúcar o zumo de remolacha azucarera mediante *Lactobacillus delbrueckii* (Calabia et al., 2007).

Se han descrito dos sistemas diferentes para la captación y el uso de la sacarosa en bacterias sacarosa-positivas (es decir, bacterias capaces de utilizar sacarosa).

El primero se basa en un sistema de fosfotransferasa de sacarosa (sacarosa PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) en el que la sacarosa se capta y se fosforila utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) como donante para producir sacarosa-6-fosfato intracelular. Después, la sacarosa-6-fosfato intracelular se hidroliza a D-glucosa-6-fosfato y D-fructosa mediante una invertasa. La D-fructosa se fosforila más hasta D-fructosa-6-fosfato mediante una fructocinasa dependiente de ATP y después puede entrar en el metabolismo central. Este sistema se ha descrito en varias especies de bacterias, tanto gram-positiva como gram-negativa. Entre las enterobacterias, un porcentaje superior al 90% de las cepas de *Klebsiella* de tipo salvaje pero inferior al 50% de *Escherichia* e inferior al 10% de la *Salmonella* presentan sacarosa.

Un plásmido conjugativo pUR400 portador de los genes scrKYABR que codifican para la sacarosa PTS se ha aislado a partir de la *Salmonella* (Schmid et al., 1982, Schmid et al., 1988).

Recientemente se ha descubierto un segundo sistema no PTS en *E. coli* EC3132 (Bockman et al., 1992). Este sistema implica los genes cscBKAR que codifican para un sistema de transporte simporte de sacarosa:protón (CscB), una fructocinasa (CscK), una invertasa (CscA) y un represor específico de la sacarosa (CscR).

La *Escherichia coli* K12 y sus derivados (incluyendo MG1655) no pueden utilizar sacarosa. Sin embargo, esta capacidad se puede conferir mediante la transferencia de los genes que codifican los dos sistemas descritos anteriormente. Esto se ha demostrado mediante la transferencia de plásmido pUR400 a *E. coli* K12 (Schmid et al., 1982) o plásmidos diferentes (incluyendo pKJL101-1) portadores de los genes cscBKAR en una cepa de *E. coli* sacarosa negativa (Jahreis et al., 2002). En cuanto a la aplicación industrial, la producción de triptófano a partir de sacarosa se ha descrito en *E. coli* K12 (Tsunekawa et al., 1992) la producción de hidrógeno se ha descrito en *E. coli* portador del plásmido pUR400 (Penfold and Macaskie, 2004) y la producción de diferentes aminoácidos mediante la transferencia de ambos sistemas, se ha descrito de PTS y no PTS en la solicitud de patente EP1149911.

5 La producción de 1,2-propanodiol a partir de sacarosa se menciona en *Clostridium thermosaccharolyticum* (renombrado posteriormente como *T. thermosaccharolyticum*) por Cameron y Cooney (1986) pero sólo se registraron trazas mientras que con otras fuentes de carbono se obtuvieron cantidades superiores a 3 g/l con rendimientos superiores a 0,1 g/g de sustrato.

10 La producción de 1,2-propanodiol a partir de sacarosa también se menciona en la solicitud de patente WO98/37204. Sin embargo, la cepa de *E. coli* AA200 transformada con el plásmido pSEARX produce sólo 7 mg/l de 1,2-propanodiol a partir de 10 g/l de sacarosa, mientras que el mismo microorganismo produce entre 49 a 71 mg/l de 1,2-propanodiol a partir de monosacáridos. Estas cifras de producción muy bajas arrojan dudas sobre la verdadera capacidad de estos organismos para producir 1,2-propanodiol a partir de sacarosa. Así, la cepa AA200, que deriva de la *E. coli* K12, no debería presentar la capacidad de importar y metabolizar la sacarosa.

15 Estos informes previos indican claramente al experto en la materia que la utilización de la sacarosa para producir 1,2-propanodiol no era una buena opción.

20 Sorprendentemente, mediante la introducción de diferentes sistemas para el uso de la sacarosa en las cepas de *E. coli* no capaces de utilizar sacarosa, en el contexto de la presente invención se pudo obtener un rendimiento mejorado para la producción de 1,2-propanodiol a partir de sacarosa.

Además, en el contexto de la presente invención han demostrado que un medio que contiene sacarosa, como un zumo o melazas de una planta de materia prima, se podría utilizar como un sustrato para la producción fermentativa de 1,2-propanodiol.

25 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de 1,2-propanodiol mediante fermentación, que comprende:

- 30 • cultivar un microorganismo que produce 1,2-propanodiol en un medio adecuado que comprende una fuente de sacarosa, y
- recuperar el 1,2-propanodiol que se ha producido,

35 en el que el microorganismo es capaz de utilizar sacarosa como única fuente de carbono para la producción de 1,2-propanodiol, y en el que el microorganismo se modifica genéticamente mediante la introducción de los genes scrKYABR o cscBKAR.

40 En particular, esta sacarosa se obtiene a partir de biomasa, en particular a partir de biomasa de plantas.

40 Descripción detallada de la invención

45 Tal como se utilizan en la presente memoria, los siguientes términos se pueden utilizar para interpretar las reivindicaciones y la descripción.

Según la invención, los términos “cultivo”, “crecimiento” y “fermentación” se utilizan de forma intercambiable para referirse al crecimiento de la bacteria en un medio de crecimiento adecuado que contiene una fuente de carbono simple. La fermentación es un procedimiento clásico que se puede realizar bajo condiciones aeróbicas, microaeróbicas o anaeróbicas.

50 El término “medio adecuado” se refiere a un medio de composición molecular conocida adaptado al crecimiento del microorganismo. En particular, este medio contiene por lo menos una fuente de fósforo y una fuente de nitrógeno. Este medio adecuado es, por ejemplo, un medio de cultivo mineral con una composición conocida adaptado a la bacteria que se utiliza, y que contiene por lo menos una fuente de carbono. Este medio adecuado también puede designar cualquier líquido que comprende una fuente de hidrógeno y/o una fuente de fósforo, y dicho líquido se añade y/o se mezcla con la fuente de sacarosa. En particular, el medio de crecimiento mineral para las enterobacterias puede presentar, por consiguiente, una composición idéntica o similar al medio M9 (Anderson, 1946), al medio M63 (Miller, 1992) o a un medio como el definido por Schaefer et al. (1999), y en particular, el medio de cultivo mínimo denominado MML1IPG1_100 descrito a continuación:

Tabla 1: composición del medio mínimo MML1IPG1_100 con glucosa como fuente de carbono.

Constituyente	Concentración (g/l)
EDTA	0,0084
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,0025
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,0150
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,0015
H ₃ BO ₃	0,0030
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,0025
Zn(CH ₃ COO) ₂ 2H ₂ O	0,0130
Citrato de Fe(III) H ₂ O	0,1064
Ácido cítrico	1,70
KH ₂ PO ₄	1,65
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,92
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,40
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,88
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,00
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,08
Tiamina	0,01
Glucosa	20,00
Tampón MOPS	40,00

El pH del medio se ajusta a 6,8 con hidróxido sódico.

- 5 La fuente de carbono “glucosa” se puede reemplazar en este medio por otra fuente de carbono, especialmente con sacarosa u otra fuente de carbono que contenga sacarosa como el zumo de caña de azúcar o el zumo de azúcar de remolacha.
- 10 El medio de crecimiento para Clostridiaceae puede presentar una composición idéntica o similar al medio de cultivo clostridial (CGM, Wiesenborn et al., 1987) o un medio de cultivo mineral como el proporcionado por Monot et al. (1982) o Vasconcelos et al. (1994).
- 15 El término “sacarosa” se refiere a un disacárido de glucosa y fructosa unido mediante una unión $\alpha(1,2)$ glicosídica, con la fórmula molecular C₁₂H₂₂O₁₁. Su nombre sistemático es α -D-glucopiranosil-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-fructofuranoósido.
- El término “fuente de sacarosa” se refiere a un medio, líquido o sólido, que contiene sacarosa en diferentes concentraciones, en particular entre 1 a 100% de sacarosa.
- 20 El término “producción de 1,2-propanodiol” significa que la producción del microorganismo en el caldo de cultivo se puede registrar inequívocamente mediante mecanismos analíticos habituales conocidos por los expertos en la materia. El límite de cuantificación por HPLC para el 1,2-propanodiol, que es la técnica preferida utilizada para cuantificar este compuesto, es 25 mg/l. Por consiguiente, el término “producción de 1,2-propanodiol” significa según la invención que los niveles de producción deben ser superiores a 25 mg/l.
- 25 El término “capaz de utilizar sacarosa como única fuente de carbono” indica que el microorganismo puede crecer en un medio que contiene sacarosa como única fuente de carbono. Por consiguiente, la definición “microorganismo capaz de utilizar sacarosa como única fuente de carbono para la producción de 1,2-propanodiol” significa que el microorganismo, cuando crece en un medio que contiene sacarosa como única fuente de carbono, puede producir por lo menos 25 mg/l de 1,2-propanodiol. Sin embargo, se entiende que en el procedimiento para la producción de 1,2-propanodiol según la invención, la fuente de sacarosa en el medio de cultivo puede comprender fuentes de carbono adicionales además de la sacarosa como hexosas (como glucosa, galactosa o lactosa), pentosas, monosacáridos, disacáridos (como sacarosa, celobiosa o maltosa), oligosacáridos, almidón o sus derivados, hemicelulosas, glicerol y sus combinaciones.
- 30 Según la invención, el microorganismo se ha modificado genéticamente para que sea capaz de utilizar sacarosa como única fuente de carbono para la producción de 1,2-propanodiol.
- 35 En una forma de realización específica de la invención, el microorganismo comprende genes funcionales que codifican un sistema de utilización de sacarosa PTS. Un sistema PTS de utilización de sacarosa es un sistema para la utilización de sacarosa basado en el transporte de la sacarosa mediante un sistema de fosfotransferasa de sacarosa (PTS de sacarosa) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP). Un sistema de fosfotransferasa acopla el transporte de un azúcar (por ejemplo, sacarosa o glucosa) con la fosforilación del azúcar utilizando PEP como donantes de fosfato. Después del transporte a la célula, la sacarosa-fosfato se adhiere en la glucosa-6-fosfato y la fructosa mediante una invertasa. Después, la fructosa se fosforila a fructosa-6-fosfato mediante una fructocinasa. Los genes que codifican para este sistema PTS de utilización de sacarosa se pueden controlar mediante una
- 40
- 45

proteína reguladora.

5 En este primer aspecto de la invención, el microorganismo expresa de forma natural o se ha modificado con la introducción de los genes *scrKYABR* (*scrK* que codifica para una fructocinasa *scrY* que codifica para una porina, *scrA* que codifica para una proteína IIBC, *scrB* que codifica para una invertasa de la sacarosa-6-P, *scrR* que codifica para un represor) de la *Salmonella*. Para transformar el microorganismo se puede utilizar un plásmido conjugativo pUR400 portador de estos genes *scrKYABR*. Estos genes se pueden utilizar todos juntos en combinación, o en cualquier combinación que comprenda por lo menos uno de estos genes. En particular, el gen *scrR* se puede omitir.

10 La designación de estos genes presenta un significado más general según la invención, y abarca a los genes correspondientes en otros microorganismos. Utilizando las referencias del GenBank de los genes de la *Salmonella*, los expertos en la materia pueden determinar genes equivalentes en otros organismos que no sean la *Salmonella*.

15 Los mecanismos de identificación de las secuencias homólogas y de su porcentaje de homología son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen en particular los programas BLAST que se pueden utilizar en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> con los parámetros indicados por defecto en esa página web. Las secuencias obtenidas se pueden explotar (alineal) utilizando, por ejemplo, los programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), con los parámetros por defecto indicados en estas páginas web.

20 La base de datos PFAM (base de datos de familias de proteínas de alineamientos y modelos Markov ocultos (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>)) es una colección amplia de alineamientos de secuencias de proteínas. Cada PFAM hace posible visualizar múltiples alineamientos, ver dominios de proteínas, evaluar distribuciones entre organismos, obtener acceso a otras bases de datos y visualizar estructuras de proteínas conocidas.

25 Los COG (complejos de grupos ortólogos de proteínas <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se obtienen comparando secuencias de proteínas derivadas de 66 genomas unicelulares completamente secuenciados que representan las 14 líneas filogenéticas principales. Cada COG se define a partir de por lo menos tres líneas, haciendo posible identificar dominios antiguos conservados.

30 Un experto en la materia puede utilizar actualmente varias técnicas para la introducción del ADN en la cepa bacteriana. Una técnica preferida es la electroporación, que es conocida por los expertos en la materia.

35 En otra forma de realización de la invención, el microorganismo comprende genes funcionales que codifican un sistema de utilización de sacarosa sin PTS. Un sistema de utilización de sacarosa sin PTS es un sistema para la utilización de la sacarosa basado en el transporte de la sacarosa mediante un sistema independiente del fosfoenolpiruvato. Después del transporte a la célula, la sacarosa se rompe para proporcionar glucosa y fructosa mediante una invertasa. Después, la fructosa se fosforila en fructosa-6-fosfato mediante una fructocinasa y la glucosa se fosforila en glucosa-6-fosfato mediante una glucoquinasa. Estos genes que codifican para este sistema de utilización de sacarosa sin PTS se pueden controlar mediante una proteína reguladora. En este segundo aspecto de la invención, el microorganismo se expresa de forma natural o se ha modificado con la introducción de genes de la *E. coli* EC3132, es decir, los genes *cscBKAR* que codifican para una sacarosa: sistema de transporte simport de protón (*cscB*), una fructocinasa (*cscK*), una invertasa (*cscA*) y un represor específico de la sacarosa (*cscR*). Estos genes se pueden utilizar todos juntos en combinación o en cualquier combinación que comprenda por lo menos uno de estos genes. En particular, el gen *cscR* se puede omitir. Se pueden utilizar los genes homólogos de otros organismos.

45

La designación de estos genes presenta un significado más general según la invención, y comprende los genes correspondientes en otros microorganismos. Utilizando las referencias del GenBank de los genes de la *E. coli*, los expertos en la materia pueden determinar genes equivalentes en otros organismos diferentes de *E. coli* (ver anteriormente).

50

El microorganismo de la invención se caracteriza por una actividad mejorada de la vía de biosíntesis del 1,2-propanodiol. Los microorganismos optimizados para la producción de 1,2-propanodiol se han dado a conocer de forma exhaustiva en las solicitudes de patente WO 2005/073364, WO 2008/116853, WO 2008/116852 y WO 2008/116848.

55

Los microorganismos que se utilizan en la invención son bacterias, levadura u hongos.

60 Preferentemente, el microorganismo se selecciona de entre el grupo que consiste en *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Streptomyetaceae* y *Corynebacteriaceae*.

Más preferentemente, el microorganismo se selecciona de entre el grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Clostridium sphenoides* o *Saccharomyces cerevisiae*.

65 Las condiciones de cultivo para el proceso de fermentación se pueden definir fácilmente por los expertos en la materia. En particular, las bacterias se fermentan a temperaturas de entre 20°C y 55°C, preferentemente entre 25°C

y 40°C, y preferentemente a aproximadamente 35°C para los Clostridiaceae y a aproximadamente 37°C para las Enterobacteriaceae.

5 Este procedimiento se puede realizar tanto en proceso por lotes, en un proceso por lotes alimentados o en un proceso continuo. La fermentación es un proceso habitual que se puede realizar bajo condiciones aeróbicas, microaeróbicas o anaeróbicas.

10 “Bajo condiciones aeróbicas” significa que se proporciona oxígeno al cultivo mediante la disolución de gas en la fase líquida. Esto se puede obtener mediante (1) el barbotaje de gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) en la fase líquida o (2) mediante la agitación del recipiente que contiene el medio de cultivo para transferir el oxígeno contenido en el espacio superior de la fase líquida. Las ventajas de la fermentación bajo condiciones aeróbicas en lugar de condiciones anaeróbicas es que la presencia de oxígeno como un aceptor del oxígeno mejora la capacidad de la cepa para producir más energía en forma de ATP para los procesos celulares. Por consiguiente, la cepa mejora su metabolismo general.

15 Las condiciones microaeróbicas se definen como condiciones de cultivo en las se disuelven porcentajes de oxígeno bajos (por ejemplo, utilizando una mezcla de gas que contiene entre 0,1 y 10% de oxígeno, completado hasta el 100% con nitrógeno) en la fase líquida.

20 Las condiciones anaeróbicas se definen como condiciones de cultivo en las que no se proporciona oxígeno al medio de cultivo. Las condiciones estrictamente anaeróbicas se obtienen mediante el barbotaje de un gas inerte como el nitrógeno en el medio de cultivo para extraer restos de otro gas. El nitrato se puede utilizar como aceptor del electrón para mejorar la producción de ATP por parte de la cepa y para mejorar su metabolismo.

25 En un aspecto específico de la invención, la fuente de sacarosa se obtiene de una biomasa, en particular de una biomasa vegetal. Se puede utilizar toda la planta o una parte específica de la planta para preparar el material de partida utilizado como fuente de sacarosa. La preparación se puede basar en uno de los tratamientos conocidos por los expertos en la materia para extraer la sacarosa de una biomasa vegetal que contiene sacarosa.

30 En un aspecto preferido de la invención, la fuente de sacarosa se obtiene de una planta que se selecciona de entre el grupo que consiste en: caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce, arce de azúcar, palma de azúcar y agave azul.

35 En particular, la fuente de sacarosa se puede obtener de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera.

Según la invención, se pueden utilizar formas diferentes de fuente de sacarosa, como un zumo, un zumo concentrado, un jarabe, un zumo clarificado, melazas o sacarosa cristalizada.

40 Una forma preferida es el zumo crudo de la caña de azúcar, extraído directamente de la planta sin ningún tratamiento. Brevemente, la caña de azúcar recolectada se limpia antes de proceso de moltura para la extracción del zumo. Se rompe la estructura de la caña y después se pulveriza, y al mismo tiempo se extrae la sacarosa con agua para obtener el zumo crudo.

45 Después, se puede aclarar el zumo crudo mediante la adición de cal y aplicando calor y el zumo clarificado se separa del precipitado. Se obtiene jarabe concentrado mediante evaporación.

En otra forma de realización de la invención, la fuente de sacarosa puede ser un producto final, un producto intermedio o un subproducto o de la industria de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera.

50 Como algunas fuentes de sacarosa, particularmente las que se obtienen a partir de biomasa como las indicadas anteriormente, contiene otros nutrientes que se pueden utilizar para el crecimiento de microorganismos en adición a la fuente de carbono, se puede designar un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos utilizando la fuente de sacarosa solamente, es decir, el medio adecuado consiste en la fuente de sacarosa, o mediante la complementación de la fuente de sacarosa con una fuente de fósforo y/o una fuente de nitrógeno.

55 Preferentemente, la fuente de sacarosa comprende por lo menos un 7% de sacarosa.

Ejemplos

60 **Ejemplo 1: Construcción de dos cepas de *E. coli* que producen 1,2-propanodiol y que son capaces de utilizar sacarosa como única fuente de carbono:**

65 Se obtuvo la cepa de *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::Cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd evolucionada en un cultivo quimioestático bajo unas condiciones anaeróbicas y adaptado para el crecimiento en un medio mínimo como se describe en el documento WO 2008/116852. Esta cepa se denominó cepa evolucionada de *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::Cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd .

El casete de resistencia al cloranfenicol se eliminó en esta cepa evolucionada y se revisó la presencia de las modificaciones construidas previamente como se ha descrito anteriormente en el documento WO 2008/116852.

- 5 Se utilizaron dos plásmidos para conferir la capacidad de utilizar sacarosa para dicha cepa de *E. coli*:
- pUR400, portador de los genes que codifican el sistema de PTS -sacarosa tal como se describe en Schmid et al. (1982)
 - pKJL101.1, portador de los genes que codifican la permeasa de sacarosa y el sistema de quinasa tal como se describe en Jahris et al. (2002).

Estos plásmidos se introdujeron separadamente en la cepa evolucionada de *E. coli* MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd mediante electroporación.

15 Las dos cepas obtenidas se denominaron respectivamente:

- *E. coli* evolucionada MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pUR400), y
- *E. coli* evolucionada MG1655 *lpd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pKJL101.1).

20 **Ejemplo 2: producción de 1,2-propanodiol con sacarosa como única fuente de carbono:**

Las cepas obtenidas como se describe en el Ejemplo 1 y la cepa sin el plásmido utilizada como control se cultivaron en un frasco de ensayos Erlenmeyer bajo unas condiciones aeróbicas en un medio mínimo MML11PG1_100 (ver composición anteriormente) con 20 g/l de glucosa o sacarosa como única fuente de carbono. La glucosa como fuente de carbono se utilizó como control.

El cultivo se realizó a una temperatura de 34°C y el pH se mantuvo tamponando el medio de cultivo con MOPS.

Al final del cultivo, se analizaron el 1,2-propanodiol, la glucosa o la sacarosa residual en el caldo de fermentación mediante HPLC y se calcularon los rendimientos de 1,2-propanodiol en glucosa o los rendimientos de 1,2-propanodiol en sacarosa.

Tabla 2: producción de 1,2-propanodiol en un medio mínimo con glucosa o sacarosa como fuente de carbono.

Cepa/Fuente de carbono	Título de 1,2-propanodiol (g/l)	Rendimiento de 1,2-propanodiol (g/g de fuente de carbono)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd /sacarosa	ND (n=1)	- (n=1)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pUR400)/glucosa	3,89 +/- 0,12 (n=3)	0,20 +/- 0,01 (n=3)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pUR400)/sacarosa	2,26 +/- 0,27 (n=6)	0,12 +/- 0,01 (n=6)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pKJL101.1)/glucosa	3,55 +/- 0,21 (n=3)	0,19 +/- 0,01 (n=3)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 * <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pKJL101.1)/sacarosa	4,86 +/- 0,77 (n=6)	0,26 +/- 0,03 (n=6)

ND significa "no detectado".

n es la número de repeticiones del mismo experimento.

Las cifras proporcionadas son la media y la desviación estándar de las cifras obtenidas para n repeticiones.

Ejemplo 3: producción de 1,2-propanodiol con zumo de caña de azúcar como fuente de carbono:

Las cepas obtenidas como se describe en el Ejemplo 1 se cultivaron en un frasco de ensayos Erlenmeyer bajo unas condiciones aeróbicas en un medio mínimo MML11PG1_100 con zumo de caña de azúcar (equivalente a 20 g/l de sacarosa) como fuente de carbono.

El zumo de caña de azúcar utilizado en este experimento se obtuvo de un molino de azúcar en el área del sudeste

asiático y se recolectó justo después de la clarificación del zumo crudo con cal.

El cultivo se realizó a una temperatura de 34°C y el pH se mantuvo tamponando el medio de cultivo con MOPS. Al final del cultivo, se analizaron el 1,2-propanodiol, y la glucosa, la sacarosa y la fructosa residual en el caldo de fermentación mediante HPLC y se calculó el rendimiento de 1,2-propanodiol para la suma de fuentes de carbono.

Tabla 3: producción de 1,2-propanodiol en un medio mínimo con zumo de caña de azúcar como fuente de sacarosa.

Cepa/Fuente de carbono	Título de 1,2-propanodiol (g/l)	Rendimiento de 1,2-propanodiol (g/g de fuente de carbono)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pUR400)/zumo de caña de azúcar	3,43 +/- 0,22 (n=2)	0,15 +/- 0,01 (n=2)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pKHL101.1)/zumo de caña de azúcar	3,94 +/- 0,94 (n=3)	0,26 +/- 0,01 (n=3)

n es la número de repeticiones del mismo experimento.

Las cifras proporcionadas son la media y la desviación estándar de las cifras obtenidas para n repeticiones.

Ejemplo 4: producción de 1,2-propanodiol con zumo de caña de azúcar sólo o con suplemento de nutrientes:

Las cepas obtenidas como se describe en el Ejemplo 1 se cultivaron en un frasco de ensayos Erlenmeyer bajo condiciones aeróbicas en un medio que contenía zumo de caña de azúcar diluido (equivalente a 20 g/l de sacarosa) sin suplemento o con un suplemento de fosfato y amonio ((NH₄)₂HPO₄ 2,5 g/l), hierro (Citrato de Fe, H₂O 0,1 g/l) y tiamina (0,02 g/l).

El cultivo se realizó a una temperatura de 34°C y el pH se mantuvo tamponando el medio de cultivo con MOPS (40 g/l). Al final del cultivo, se analizaron el 1,2-propanodiol, y la glucosa, la sacarosa y la fructosa residual en el caldo de fermentación mediante HPLC y se calculó el rendimiento de 1,2-propanodiol para la suma de fuentes de carbono.

Tabla 4: producción de 1,2-propanodiol en zumo de caña de azúcar sin suplemento o en zumo de caña de azúcar con suplemento.

Cepa/Fuente de carbono	Título de 1,2-propanodiol (g/l)	Rendimiento de 1,2-propanodiol (g/g de fuente de carbono)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pUR400)/zumo de caña de azúcar	0,42 (n=1)	0,05 (n=1)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pKJL101.1)/zumo de caña de azúcar	1,07 (n=1)	0,12 (n=1)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pUR400)/zumo de caña con suplemento	2,29 +/- 0,02 (n=2)	0,14 +/- 0,00 (n=2)
<i>E. coli</i> evolucionada MG1655 <i>lpd*</i> , $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd (pKJL101.1)/ zumo de caña con suplemento	4,08 +/- 0,02 (n=2)	0,26 +/- 0,00 (n=2)

n es la cantidad de repeticiones del mismo experimento.

Las cifras proporcionadas son la media y la desviación estándar de las cifras obtenidas para n repeticiones.

Referencias (por orden de aparición en el texto)

Badia J, Ros J, Aguilar J (1985), *J. Bacteriol.* 161: 435-437

Tran Din K and Gottschalk G (1985), *Arch. Microbiol.* 142: 87-92

Cameron DC and Cooney CL (1986), *Bio/Technology*, 4: 651-654

Sanchez-Rivera F, Cameron DC, Cooney CL (1987), *Biotechnol. Lett.* 9: 449-454

Altaras NE, Etzel MR, Cameron DC (2001), *Biotechnol. Prog.* 17: 52-56

- Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ (1998), *Biotechnol. Prog.* 14: 116-125
- Altaras NE and Cameron DC (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1180-1185
- 5 Altaras NE and Cameron DC (2000), *Biotechnol. Prog.* 16: 940-946
- Huang K, Rudolph FB, Bennett GN (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3244-3247
- 10 Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN (2003), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 34-40
- Peters D (2006), *Biotechnol. J.* 1: 806-814
- Beckers M, Linde R, Danilevich A, Kaminska E, Upite D, Vigants A, Scherbaka R (1999), *Food Biotechnol.* 13: 107-119
- 15 Shukla VB, Zhou S, Yomano LP, Shanmugam KT, Preston JF, Ingram LO (2004), *Biotechnol. Lett.* 26: 689-693
- Calabia BP and Tokiwa Y (2007), *Biotechnol. Lett.* 29: 1329-1332
- 20 Schmid K, Schupfner M, Schmitt R (1982), *J. Bacteriol.* 151: 68-76
- Schmid K, Ebner R, Altenbuchner J, Sxhmitt R, Lengeler JW (1988), *Mol. Microbiol.* 2: 1-8
- 25 Schmid K, Schupfner M, Schmitt R (1982), *J. Bacteriol.* 151: 68-76
- Bockmann J, Heuel H, Lengeler JW (1992), *Mol. Gen. Genet.* 235: 22-32
- 30 Jahreis K, Bentler L, Bockmann J, Hans S, Meyer A, Siepelmeier J, Lengeler JW (2002), *J. Bacteriol.* 184: 5307-5316
- Tsunekawa H, Azuma S, Okabe M, Okamoto R, Aiba S (1992), *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2081-2088
- Penfold DW and Macaskie LE (2004), *Biotechnol. Lett.* 26: 1879-1883
- 35 Anderson EH (1946), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32: 120-128
- Miller (1992), *A short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 40 Schaefer U, Boos U, Takors R, Weuster-Botz D (1999), *Anal. Biochem.* 270: 88-96
- Wiesenborn DP, Rudolph RB, Papoutsakis ET (1987), *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2717-2722
- 45 Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R (1982), *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1318-1324
- Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P (1994), *J. Bacteriol.* 176: 1443-1450

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción de 1,2-propanodiol mediante fermentación, que comprende las etapas siguientes:
- cultivar un microorganismo que produce 1,2-propanodiol en un medio adecuado que comprende una fuente de sacarosa, y
 - recuperar el 1,2-propanodiol que se ha producido,
- 10 en el que el microorganismo se modifica genéticamente para poder utilizar la sacarosa como única fuente de carbono para la producción de 1,2-propanodiol, con la introducción de genes *scrKYABR* que codifican un sistema PTS de utilización de sacarosa, o genes *cscBKAR* que codifican un sistema no PTS de utilización de sacarosa.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se selecciona de entre el grupo que consiste en bacterias, levadura y hongos.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el microorganismo se selecciona de entre el grupo que consiste en *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Streptomycetaceae* y *Corynebacteriaceae*.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el microorganismo se selecciona de entre el grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Clostridium sphenoides* o *Saccharomyces cerevisiae*.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha fuente de sacarosa se obtiene a partir de la biomasa.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha fuente de sacarosa se obtiene de una planta seleccionada de entre el grupo que consiste en: caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce, arce de azúcar, palma de azúcar y agave azul.
- 30 7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, en el que dicha fuente de sacarosa se encuentra en forma de zumo, jarabe o zumo concentrado, zumo clarificado, melazas o sacarosa cristalizada.
- 35 8. Procedimiento según las reivindicaciones 5 a 7, en el que dicha fuente de sacarosa es un producto final, un producto intermedio o un subproducto de la industria de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el medio adecuado consiste en la fuente de sacarosa.
- 40 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el medio adecuado contiene por lo menos una fuente de fósforo y/o una fuente de nitrógeno además de la fuente de sacarosa.
- 45 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha fuente de sacarosa comprende por lo menos 7% de sacarosa.