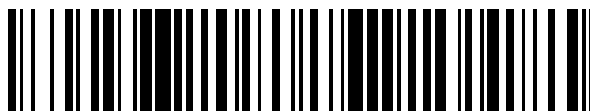


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 078**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 7/04 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2010 E 10817144 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2479255**

54 Título: **Bacteria productora de alcohol isopropílico y método para producir alcohol isopropílico**

30 Prioridad:

16.09.2009 JP 2009214694

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

17.06.2015

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;
TAKAHASHI, HITOSHI;
TAKEBAYASHI, NOZOMI y
WADA, MITSUFUMI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 538 078 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

Bacteria productora de alcohol isopropílico y método para producir alcohol isopropílico

Campo de la técnica

5 La presente invención hace referencia a una bacteria que produce alcohol isopropílico y a un método para producir alcohol isopropílico.

Estado del arte previo

El propileno es una importante materia prima básica para las resinas sintéticas tales como el polipropileno y para productos petroquímicos, y se utiliza ampliamente por ejemplos para amortiguadores de automóviles, envases alimenticios, películas, e instrumentos médicos.

10 El alcohol isopropílico producido a partir de materias primas procedentes de plantas puede convertirse en propileno mediante un proceso de deshidratación. Por lo tanto, el alcohol isopropílico es una materia prima prometedora neutra en carbono para el propileno. El protocolo de Kyoto pidió a las naciones industrializadas que redujeran sus emisiones totales de dióxido de carbono a partir de los niveles de 1990 en un 5 por ciento para 2008-2012. Por lo tanto, el propileno neutro en carbono es en la actualidad extremadamente importante debido a su versatilidad, en
15 vista del medio ambiente global.

Ya se conocen bacterias que asimilan las materias primas procedentes de plantas y producen alcohol isopropílico. Por ejemplo, el documento WO 2009/008377 revela una bacteria que ha sido modificada para lograr una gran producción de alcohol isopropílico a partir de glucosa como materia prima, y describe que la bacteria es un biocatalizador excelente para la producción industrial de alcohol isopropílico.

20 Se sabe que la *Escherichia coli* no puede asimilar la sacarosa. Sin embargo, resultaría ventajoso desde un punto de vista industrial si la sacarosa, que entre las materias primas procedentes de las plantas no es costosa, pudiera utilizarse.

Atendiendo al conocimiento tradicional, el mecanismo de asimilación de la sacarosa por parte de microorganismos se clasifica en líneas generales en dos sistemas, es decir, el sistema PTS de sacarosa (fosfoenolpiruvato: sistema de fosfotransferasa de carbohidratos) y el sistema no-PTS de sacarosa (por ejemplo, JP-A No. 2001-346578). Se sabe que el sistema no PTS de sacarosa está compuesto de cuatro factores, es decir, cscB (que incorpora sacarosa), cscA (que descompone la sacarosa en microorganismos), cscK (que fosforila la fructosa), y cscR (que controla las expresiones de cscB, A, y K). En Biotechnology Letters, Vol. 27, pp. 1891-1896 (2005), se describe que los genes de estos cuatro factores fueron introducidos en *Escherichia coli* productora de ácido D-láctico utilizando
25 plásmidos, produciendo de ese modo ácido D-láctico a partir de sacarosa.

Además, se sabe que el sistema PTS de sacarosa está compuesto de cinco factores, es decir, scrA (que incorpora sacarosa); scrY (que fosforila sacarosa); scrB (que descompone sacarosa en microorganismos); scrR (que controla las expresiones de scrA, Y, y B), y scrK (que fosforila la fructosa).

35 Cuando una habilidad que un microorganismo no posee debe ser introducida en dicho microorganismo, se estudia generalmente la introducción de un gen que expresa dicha habilidad. En el caso de la habilidad para la asimilación de sacarosa, los ADN de los factores mencionados anteriormente presentan tamaños desde 900 a 1500 pb, y el tamaño total del ADN requerido para expresar los genes de las cuatro enzimas (tiolasa, transferasa CoA, acetoacetato descarboxilasa, y alcohol isopropílico deshidrogenasa), necesario para la elevada producción de alcohol isopropílico es de aproximadamente 4800 pb. En otras palabras, la introducción de un ADN con un tamaño de aproximadamente 9300 pb sería necesaria para conferir tanto la habilidad de asimilación de sacarosa como la habilidad productora de IPA a la *Escherichia coli*.
40

Sin embargo, la introducción simultánea de la misma en la *Escherichia coli* es extremadamente difícil, ya que el tamaño de ADN a ser introducido excedería el límite superior del tamaño de ADN que el plásmido puede alojar. Incluso si se utilizaran dos tipos de vectores plasmídicos para reducir el tamaño del ADN de cada plásmido a 10000
45 pb o menos, cualquiera o ambos de los dos tipos de plásmidos introducidos en la *Escherichia coli* sería susceptible de ser eliminado durante el crecimiento repetitivo. La *Escherichia coli* necesitaría estar expuesta de forma continua a una sustancia antibiótica costosa como un marcador de selección para evitar el anterior problema, y tal necesidad no resulta adecuada para la producción a escala industrial.

50 Por consiguiente, resulta difícil conferir simultáneamente tanto la habilidad de asimilar la sacarosa como la habilidad de una elevada producción de alcohol isopropílico a la *Escherichia coli*.

En Can. J. Microbiol., Vol. 45, pp. 18-422 (1999) se revela que como resultado de la introducción de sacarosa hidrolasa (cscA) sola en la *Escherichia coli*, la *Escherichia coli* crecía utilizando sacarosa como materia prima. Sin embargo, el artículo también demuestra que cuando el gen cscA se expresaba de forma elevada mediante tecnología de recombinación genética, casi todos los cscA estaban presentes en las células. Por tanto, el cscA (invertasa) trabaja en el interior de las células en lugar de en el exterior de las células, y no puede esperarse que el cscA descomponga la sacarosa en el exterior de las células.

Un ejemplo de material de producción a partir de la sacarosa utilizando *Escherichia coli*, la cual no puede asimilar sacarosa, es la producción de triptófano utilizando sacarosa como materia prima (por ejemplo, JP-A No. 2001-346578). Sin embargo, en este ejemplo, se demuestra que la introducción de un grupo de genes que incluya al menos cscA, cscB, y cscK es necesario para conferir la habilidad para producir aminoácidos a partir de la sacarosa a la *Escherichia coli*.

Resumen de la invención

Problema técnico a resolver por la invención

Tal como se ha tratado anteriormente, ha sido extremadamente difícil conferir simultáneamente la habilidad de asimilar sacarosa y la habilidad de producir alcohol isopropílico de forma elevada a la *Escherichia coli*, la cual no puede asimilar la sacarosa, debido al tamaño excesivamente grande del ADN a ser introducido.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico y un método para producir alcohol isopropílico que sea de utilidad para la producción eficiente de alcohol isopropílico a partir de la sacarosa, que no sea costoso y que presente un valor de utilidad industrial elevado.

La presente invención proporciona una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico y un método para producir alcohol isopropílico según como se describe a continuación.

Medios para resolver el problema

[1] Una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que incluye al menos un gen de sacarosa hidrolasa que pertenece a un grupo de genes de un sistema no PTS de sacarosa, y un sistema de producción de alcohol isopropílico conferido o aumentado en donde la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico es una *Escherichia coli* a la que se ha conferido una actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, una actividad Co Atransferasa, y una actividad tiolasa.

[2] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], que incluye únicamente el gen de sacarosa hidrolasa de entre los genes que pertenecen a un grupo de genes de un sistema no PTS de sacarosa.

[3] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], en donde la actividad acetoacetato descarboxilasa, la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, la actividad CoA transferasa, y la actividad tiolasa se obtienen mediante la introducción de genes que codifican las respectivas enzimas que se obtienen de al menos una seleccionada del grupo que consiste en bacterias del género *Clostridium*, bacterias del género *Bacillus*, y bacterias del género *Escherichia*.

[4] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], en donde la actividad acetoacetato descarboxilasa y la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa se obtienen mediante la introducción de genes que codifican las respectivas enzimas que se obtienen de una bacteria o bacterias del género *Clostridium*, y la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen mediante la introducción de genes que codifican respectivas enzimas que se obtienen de una bacteria o bacterias del género *Escherichia*.

[5] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], en donde la actividad acetoacetato descarboxilasa se obtiene mediante la introducción de un gen que codifica una enzima procedente de *Clostridium acetobutylicum*, la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa se obtiene mediante la introducción de un gen que codifica una enzima procedente de *Clostridium beijerinckii*, y la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen mediante la introducción de genes que codifican respectivas enzimas procedentes de *Escherichia coli*.

[6] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], en donde un gen que codifica la acetoacetato descarboxilasa, un gen que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa, y el gen que codifica la sacarosa hidrolasa han sido introducidos utilizando al menos un plásmido, y la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen de genes genómicos en la *Escherichia coli* hospedadora.

[7] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [6], en donde un promotor para expresar un gen que codifica la CoA transferasa y un gen que codifica la tiolasa es al menos uno de un promotor gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o un promotor serina hidroximetil transferasa.

[8] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], en donde la actividad acetoacetato descarboxilasa, la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen todas mediante la introducción de genes que codifican respectivas enzimas derivadas de una bacteria o bacterias del género *Clostridium*.

[9] Método para producir alcohol isopropílico, que incluye la producción de alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas que contiene sacarosa utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según cualquiera de [1] a [8].

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la cantidad de reducción en los azúcares en el sobrenadante del cultivo cuando se cultiva una cepa de *Escherichia coli* B durante 10 horas utilizando glucosa y fructosa como fuentes de azúcar.

Descripción de las realizaciones

Una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la presente invención es una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que incluye al menos un gen de sacarosa hidrolasa que pertenece al grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa, y un sistema de producción de alcohol isopropílico conferido o mejorado. Se confiere actividad acetoacetato descarboxilasa, actividad isopropil deshidrogenasa, actividad CoA transferasa, y actividad tiolasa a la *E. coli*.

Un método para producir alcohol isopropílico de acuerdo con la presente invención es un método de producción de alcohol isopropílico que incluye la producción de alcohol isopropílico a partir de materia prima procedente de plantas que contiene sacarosa utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico descrita anteriormente.

Escherichia coli productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la presente invención, incluye al menos un gen de sacarosa hidrolasa que es miembro del grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa, para asimilar la sacarosa, y además tiene un sistema de producción de alcohol isopropílico. Por tanto, la *Escherichia coli*, que carece de la habilidad innata de asimilar la sacarosa, ejerce simultáneamente la habilidad de asimilar sacarosa y la habilidad de producir alcohol isopropílico, de manera que el alcohol isopropílico puede ser producido de manera eficiente a partir de la sacarosa. Hasta ahora, no existe informe alguno sobre un caso en el que el grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa sea introducido en la *Escherichia coli*, que carece de la habilidad de asimilación de sacarosa, para producir alcohol isopropílico utilizando la sacarosa como una fuente de carbono.

Con la presente invención se ha observado que, como resultado de la introducción de al menos un gen de sacarosa hidrolasa que sea miembro del grupo de genes que constituye el grupo de genes de sistema no PTS en una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, la sacarosa puede ser asimilada con una elevada eficacia en la *Escherichia coli* que produce alcohol isopropílico de forma elevada. Como resultado de esto, el tamaño del ADN a ser introducido para conferir la habilidad de asimilación de la sacarosa puede ser reducido notablemente, por lo que se posibilita conectar simultáneamente un ADN para conferir la habilidad de asimilación de sacarosa y un ADN para conferir la habilidad de producción de alcohol isopropílico a un único vector plasmídico. Por tanto, la habilidad de asimilación de sacarosa y la habilidad de producción de alcohol isopropílico puede ser conferida de forma simultánea a la *Escherichia coli*, la cual no puede asimilar la sacarosa, de manera que se puede obtener alcohol isopropílico de forma eficaz a partir de sacarosa no costosa obtenida a partir de la caña de azúcar o de remolacha azucarera, que puede ser suministrada en grandes cantidades.

En particular, la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la presente invención es capaz de asimilar glucosa y fructosa – productos de la descomposición de sacarosa – casi simultáneamente, y de producir alcohol isopropílico. Por lo tanto, la *Escherichia coli* de acuerdo a la invención presenta una mayor eficacia.

En general, se sabe que, en la *Escherichia coli*, la captación de glucosa tiene usualmente prioridad sobre la captación de fructosa, y la fructosa no se metaboliza lo suficientemente en presencia de glucosa. Por consiguiente, resulta sorprendente que se pudiera producir alcohol isopropílico de forma eficaz sin que se vea afectado por la represión catabólica por parte de la glucosa.

En la presente invención, el término “hospedador” significa *Escherichia coli* que se convertirá en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la presente invención, como resultado de la introducción de uno o más genes del exterior de la célula de la misma.

El alcance del término “proceso” tal como se utiliza en la presente patente incluye no solamente un proceso discreto, sino también un proceso que no pueda distinguirse claramente de otro proceso, siempre que el efecto esperado del proceso de interés se logre.

Además, cualquier rango numérico expresado en la presente patente utilizando “hasta” incluye los valores numéricos antes y después de “hasta” como los valores mínimos y máximos, respectivamente.

A continuación, se describe la presente invención.

El grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa en la presente invención hace referencia a un grupo de cuatro genes implicados en un sistema no PTS entre las vías de asimilación de la sacarosa de un microorganismo. Específicamente, el grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa es un grupo de genes compuesto de una proteína represora (cscR), una sacarosa hidrolasa (cscA), una fructoquinasa (cscK), y una sacarosa permeasa (cscB). En la presente invención, puede utilizarse al menos una de las mismas, incluyendo al menos cscA. Por ejemplo, puede utilizarse cscA sola, una combinación de cscA y cscK, una combinación de cscA y cscB, una combinación de cscA y cscR, una combinación de cscA, cscR, y cscK, o una combinación de cscA, cscR, y cscB. En particular, desde el punto de vista de una producción más eficaz de alcohol isopropílico, resulta preferible que se incluye únicamente un gen que codifique cscA, mientras que los otros genes del grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa no se incluyen.

La sacarosa hidrolasa (invertasa, CscA) en la presente invención hace referencia a un nombre genérico de enzimas que se clasifican según el número de código enzimático: 3.2.1.26 basado en el informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB, por sus siglas en inglés), y que catalizan una reacción de producción de D-glucosa y D-fructosa a partir de sacarosa.

Esta enzima es una enzima que la *Escherichia coli* tal como por ejemplo la cepa K12 y cepa B, no posee naturalmente, y es una de las enzimas de las vías metabólicas no PTS que incluyen un simportador de protones, una invertasa, una fructoquinasa, y un represor específico de sacarosa (ver Canadian Journal of Microbiology, (1991) vol. 45, pp 418-422). En la presente invención, como resultado de conferir CscA, en particular como resultado de conferir cscA únicamente, la sacarosa extracelular se descompone en glucosa y fructosa en la membrana celular, y la glucosa y fructosa se liberan al exterior de la célula, y se fosforilan y se incorporan al citoplasma a través de un sistema PTS de glucosa y un sistema PTS de fructosa. Como resultado, la fructosa se suministra a un sistema metabólico de fructosa en la bacteria para permitir su asimilación utilizando un sistema glucolítico.

Como gen de la sacarosa hidrolasa (invertasa, CscA) a ser introducido en la bacteria hospedadora en la presente invención, puede utilizarse un ADN con la secuencia base de un gen que codifica la sacarosa hidrolasa (invertasa, CscA) obtenido de un organismo que posee la enzima, o una secuencia de ADN sintética que se sintetiza en base a una secuencia base conocida del gen. Ejemplos preferidos incluyen aquellos procedentes de bacterias del género *Erwinia*, bacterias del género *Proteus*, bacterias del género *Vibrio*, bacterias del género *Agrobacterium*, bacterias del género *Rhizobium*, bacterias del género *Staphylococcus*, bacterias del género *Bifidobacterium*, y bacterias del género *Escherichia*. Un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia base del gen procedente de una cepa 0157 de *Escherichia coli*. Particularmente preferido es un ADN que tiene una secuencia de base del gen procedente de una cepa 0157 de *Escherichia coli*. Resulta de preferencia que se haya añadido a cscA una secuencia de señalización para transferir la cscA al periplasma de la célula bacteriana.

Como gen de la proteína represora (CscR) a ser introducido en la bacteria hospedadora en la presente invención, puede utilizarse un ADN que tenga la secuencia base de un gen que codifica la proteína represora (CscR) obtenida a partir de un organismo que posee la enzima, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza en base a una secuencia de base conocida del gen. Ejemplos preferidos incluyen aquellos procedentes de bacterias del género *Erwinia*, bacterias del género *Proteus*, bacterias del género *Vibrio*, bacterias del género *Agrobacterium*, bacterias del género *Rhizobium*, bacterias del género *Staphylococcus*, bacterias del género *Bifidobacterium*, y bacterias del género *Escherichia*. Un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia de base del gen procedente de una cepa 0157 de *Escherichia coli*. El ADN que tiene la secuencia de base del gen procedente de la cepa 0157 de *Escherichia coli* es particularmente preferido.

Como gen de la fructoquinasa (CscK) a ser introducido en la bacteria hospedadora de la presente invención, puede utilizarse un ADN que tenga la secuencia de base de un gen que codifica la fructoquinasa (CscK) obtenida a partir de un organismo que posee la enzima, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza en base a una secuencia de base conocida del gen. Ejemplos preferidos incluyen aquellos procedentes de bacterias del género *Erwinia*, bacterias del género *Proteus*, bacterias del género *Vibrio*, bacterias del género *Agrobacterium*, bacterias del género *Rhizobium*, bacterias del género *Staphylococcus*, bacterias del género *Bifidobacterium*, y bacterias del género *Escherichia*. Un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia de base del gen procedente de una cepa 0157 de *Escherichia coli*. El ADN que tiene la secuencia de base del gen procedente de una cepa 0157 de *Escherichia coli* es particularmente preferido.

Como gen de la sacarosa permeasa (CscB) a ser introducido en la bacteria hospedadora en la presente invención, puede utilizarse un ADN con la secuencia de base de un gen que codifica la sacarosa permeasa (CscB) obtenido a partir de un organismo que posee la enzima, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza en base a una secuencia de base conocida del gen. Ejemplos preferidos incluyen aquellos procedentes de bacterias del género *Erwinia*, bacterias del género *Proteus*, bacterias del género *Vibrio*, bacterias del género *Agrobacterium*, bacterias del género *Rhizobium*, bacterias del género *Staphylococcus*, bacterias del género *Bifidobacterium*, y bacterias del género *Escherichia*. Un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia de base del gen procedente de una cepa O157 de *Escherichia coli*. El ADN que tiene la secuencia de base del gen procedente de una cepa O157 de *Escherichia coli* es particularmente preferido.

La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en la presente invención hace referencia a *Escherichia coli* que posee la habilidad de producir alcohol isopropílico que ha sido introducida o modificada mediante recombinación genética. Debido a la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que posee la habilidad de producción de alcohol isopropílico introducida o modificada, en combinación con la actividad CscA mencionada anteriormente, incluso la *Escherichia coli*, que no tiene la habilidad innata de asimilación de sacarosa, se vuelve capaz de producir alcohol isopropílico de manera efectiva a partir de la sacarosa.

El alcance de la frase “mediante recombinación genética” tal como se utiliza en la presente invención incluye cualquier cambio en una secuencia de base causado por la introducción de otro ADN en la secuencia de base de un gen nativo, o mediante sustitución o delección de una región específica de un gen, o mediante cualquier combinación de la misma. Por ejemplo, la recombinación genética puede ser el resultado de la mutación.

En la presente invención, la asimilación de sacarosa hace referencia a la habilidad de incorporar sacarosa a un organismo vivo, tal como es o convirtiendo la sacarosa en una sustancia que tenga un peso molecular mayor o menor, preferiblemente en una sustancia con un peso molecular menor, o hace referencia a la habilidad de convertir metabólicamente la sacarosa en otra sustancia. El alcance de la asimilación tal como se utiliza en la presente invención, incluye una descomposición mediante la cual la sacarosa se convierte en una sustancia con un peso molecular menor, y específicamente incluye la descomposición de sacarosa en D-glucosa y D-fructosa.

El sistema productor de alcohol isopropílico en la presente invención puede ser cualquier sistema que permita que la *Escherichia coli* diana produzca alcohol isopropílico.

En la presente invención, el sistema de producción de alcohol isopropílico conferido o mejorado hace referencia a una estructura para la demostración de que la habilidad de producción de alcohol isopropílico ha sido introducida o modificada mediante recombinación genética. El sistema de producción de alcohol isopropílico es un sistema de producción de alcohol isopropílico que aumenta la producción de alcohol isopropílico de la *Escherichia coli* diana, en comparación con su producción original de alcohol isopropílico. Ejemplos preferidos incluyen inactivación, reducción, o mejora de la actividad enzimática implicada en la actividad de producción de alcohol isopropílico, o una combinación de las mismas. Debido al sistema de producción de alcohol isopropílico en combinación con la actividad CscA mencionada anteriormente, incluso la *Escherichia coli*, que no tiene la habilidad innata de asimilación de sacarosa, se vuelve capaz de producir alcohol isopropílico, de manera efectiva, a partir de sacarosa.

Cuatro tipos de actividad enzimática, es decir, actividad acetoacetato descarboxilasa, actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, actividad CoA transferasa, y actividad tiolasa son conferidas a la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de acuerdo con la presente invención.

En la presente invención, el alcance de “conferir” una actividad incluye la introducción de un gen que codifica una enzima del exterior de la célula bacteriana de la bacteria hospedadora en el interior de la célula bacteriana, y además incluye la expresión elevada de un gen de la enzima mediante la mejora de la actividad promotora de un gen de la enzima que la bacteria hospedadora posee en el genoma de la misma, o mediante sustitución con otro promotor.

En la presente invención, la acetoacetato descarboxilasa hace referencia a un nombre genérico de enzimas que se clasifican según el número de código enzimático: 4.1.1.4 en base al informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), y que catalizan una reacción de producción de acetona a partir de acetoacetato.

Ejemplos de las enzimas incluyen aquellas procedentes de bacterias del género *Clostridium*, tales como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, y las bacterias del género *Bacillus* tales como *Bacillus polymyxa*.

Como gen de la acetoacetato descarboxilasa a ser introducido en la bacteria hospedadora de la presente invención, puede utilizarse un ADN con la secuencia de base de un gen que codifica la acetoacetato descarboxilasa obtenida a partir de cualquiera de los organismos de origen de las enzimas detallados anteriormente, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza en base a una secuencia de base conocida del gen. Ejemplos preferidos incluyen aquellos procedentes de bacterias del género *Clostridium* o bacterias del género *Bacillus*. Un ejemplo es un ADN con la

secuencia de base del gen obtenido de *Clostridium acetobutylicum* o *Bacillus polymyxa*. Un ADN con la secuencia de base del gen procedente de *Clostridium acetobutylicum* es de particular preferencia.

En la presente invención, la alcohol isopropílico deshidrogenasa hace referencia a un nombre genérico de enzimas que se clasifican según el número de código enzimático: 1.1.1.80 en base al informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), y que catalizan una reacción de producción de alcohol isopropílico a partir de acetona. Ejemplos de la enzima incluyen aquellas procedentes de bacterias del género *Clostridium*, tales como *Clostridium beijerinckii*.

Como gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa a ser introducido en la bacteria hospedadora de la presente invención, puede utilizarse un ADN con la secuencia de base de un gen que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa obtenida a partir de cualquiera de los organismos de origen de las enzimas detallados anteriormente, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza en base a una secuencia de base conocida del gen. Ejemplos preferidos incluyen aquellos procedentes de bacterias del género *Clostridium*, tales como ADN con la secuencia de base del gen procedente de *Clostridium beijerinckii*.

En la presente invención, la CoA transferasa hace referencia a un nombre genérico de enzimas que se clasifican según el número de código enzimático: 2.8.3.8 en base al informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), y que catalizan una reacción de producción de acetoacetato a partir de acetoacetil CoA.

Ejemplos de la enzima incluyen aquellas procedentes de bacterias del género *Clostridium*, tales como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, bacterias del género *Roseburia*, tales como *Roseburia intestinalis*, bacterias del género *Faecalibacterium* tales como *Faecalibacterium prausnitzii*, bacterias del género *Coprococcus*, bacterias del género *Trypanosoma* tales como *Trypanosoma brucei*, y bacterias del género *Escherichia* tales como *Escherichia coli*.

Como gen de la CoA transferasa a ser introducido en la bacteria hospedadora de la presente invención, puede utilizarse un ADN con la secuencia de base de un gen que codifica la CoA transferasa obtenida a partir de cualquiera de los organismos de origen de las enzimas detallados anteriormente, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza en base a una secuencia de base conocida del gen. Ejemplos preferidos incluyen un ADN con la secuencia de base del gen procedente de una bacteria del género *Clostridium* tal como *Clostridium acetobutylicum*, una bacteria del género *Roseburia*, tal como *Roseburia intestinalis*, una bacteria del género *Faecalibacterium* tal como *Faecalibacterium prausnitzii*, una bacteria del género *Coprococcus*, una bacteria del género *Trypanosoma* tal como *Trypanosoma brucei*, o una bacteria del género *Escherichia* tal como *Escherichia coli*. Un ADN con la secuencia de base del gen procedente de una bacteria del género *Clostridium* o una bacteria del género *Escherichia* es de mayor preferencia, y un ADN con la secuencia de base del gen procedente de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli* es de particular preferencia.

En la presente invención, la tiolasa hace referencia a un nombre genérico de enzimas que se clasifican según el número de código enzimático: 2.3.1.9 en base al informe de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), y que catalizan una reacción de producción de acetoacetil CoA a partir de acetil CoA.

Ejemplos de la enzima incluye aquellas procedentes de bacterias del género *Clostridium* tales como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, bacterias del género *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, bacterias de la especie *Halobacterium*, bacterias del género *Zoogloea* tales como *Zoogloea ramigera*, bacterias de la especie *Rhizobium*, bacterias del género *Bradyrhizobium* tales como *Bradyrhizobium japonicum*, bacterias del género *Candida* tales como *Candida tropicalis*, bacterias del género *Caulobacter* tales como *Caulobacter crescentus*, bacterias del género *Streptomyces* tales como *Streptomyces collinus*, y bacterias del género *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis*.

Como gen de la tiolasa a ser introducido en la bacteria hospedadora de la presente invención, puede utilizarse un ADN con la secuencia de base de un gen que codifica la tiolasa obtenida a partir de cualquiera de los organismos de origen de las enzimas detallados anteriormente, o una secuencia de ADN sintético que se sintetiza en base a una secuencia de base conocida del gen. Ejemplos preferidos incluyen un ADN con la secuencia de base del gen procedente de una bacteria del género *Clostridium* tal como *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii*, una bacteria del género *Escherichia* tal como *Escherichia coli*, una bacteria de la especie *Halobacterium*, una bacteria del género *Zoogloea* tal como *Zoogloea ramigera*, una bacteria de la especie *Rhizobium*, una bacteria del género *Bradyrhizobium* tal como *Bradyrhizobium japonicum*, una bacteria del género *Candida* tal como *Candida tropicalis*, una bacteria del género *Caulobacter* tal como *Caulobacter crescentus*, una bacteria del género *Streptomyces* tal como *Streptomyces collinus*, o una bacteria del género *Enterococcus* tal como *Enterococcus faecalis*. Un ADN con la secuencia de base del gen obtenido a partir de una bacteria del género *Clostridium* o una bacteria del género *Escherichia* es de mayor preferencia, y un ADN con la secuencia de base del gen procedente de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli* es de particular preferencia.

Entre ellas, desde el punto de vista de la actividad enzimática, es preferible que cada una de los cuatro tipos de enzima sea una enzima procedente de al menos una seleccionada del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus*, y una bacteria del género *Escherichia*. En particular, un caso en el que la acetoacetato descarboxilasa y la alcohol isopropílico deshidrogenasa se obtienen a partir de una bacteria o bacterias del género *Clostridium*, y la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen de una bacteria o bacterias del género *Escherichia*, y un caso en el que los cuatro tipos de enzimas se obtienen todas a partir de una bacteria o bacterias del género *Clostridium*, son de mayor preferencia.

En particular, desde el punto de vista de la actividad enzimática, se prefiere que cada uno de los cuatro tipos de enzima en la presente invención proceda de cualquiera de *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, o *Escherichia coli*. Más preferiblemente, la acetoacetato descarboxilasa es una enzima procedente de *Clostridium acetobutylicum*, cada una de CoA transferasa y tiolasa es una enzima procedente de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli*, y la alcohol isopropílico deshidrogenasa es una enzima procedente de *Clostridium beijerinckii*. Con respecto a los cuatro tipos de enzimas, de forma particularmente preferible, la actividad acetoacetato descarboxilasa procede de *Clostridium acetobutylicum*, la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa procede de *Clostridium beijerinckii*, y la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa proceden de *Escherichia coli*, desde el punto de vista de la actividad enzimática.

Cuando la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa proceden de la *Escherichia coli*, preferiblemente, el gen que codifica la acetoacetato descarboxilasa, el gen que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa y el gen que codifica la sacarosa hidrolasa se introducen mediante al menos un plásmido, y la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen a partir de los genes genómicos en la *Escherichia coli* hospedadora, desde el punto de vista de la habilidad de producción de alcohol isopropílico.

En la presente invención, un ejemplo de *Escherichia coli*, de la cual se mejora la actividad enzimática implicada en la producción de alcohol isopropílico, para producir alcohol isopropílico, es la cepa pIPA/B o la cepa plaaa/B descrita en el documento WO 2009/008377.

El promotor de genes en la invención puede ser cualquier promotor que sea capaz de controlar la expresión de un gen de entre los genes anteriores. El promotor de genes puede ser un promotor potente que actúa de forma constitutiva en el microorganismo, y que no es susceptible de represión de la expresión incluso en presencia de glucosa. Ejemplos específicos del mismo incluyen el promotor gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (de aquí en adelante también denominado como GAPDH) o el promotor serina hidroximetil transferasa.

El promotor en la presente invención significa una región a la que se une una ARN polimerasa con un factor sigma para comenzar la transcripción. Por ejemplo, un promotor GAPDH procedente de *Escherichia coli* se describe en los Nos. de Bases 397-440 en la información de secuencia de base del número de acceso de GenBank X02662.

Los genes de la CoA transferasa (atoD y atoA) y un gen de la tiolasa (atoB), cada uno de los cuales se obtiene a partir de la *Escherichia coli*, forman un operón del genoma de *Escherichia coli* en el orden de atoD, atoA, y atoB (Journal of Bacteriology Vol. 169 pp 42-52 Lauren Sallus Jenkins, et al.). Por lo tanto, las expresiones de los genes de la CoA transferasa y del gen de la tiolasa pueden controlarse simultáneamente modificando el promotor de atoD.

En vista de lo anterior, cuando la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen a partir de genes genómicos de la *Escherichia coli* hospedadora, resulta preferible mejorar la expresión de ambos genes de las enzimas reemplazando, por ejemplo, el promotor responsable de la expresión de ambos genes de las enzimas por otro promotor, desde el punto de vista de la obtención de la habilidad de una suficiente producción de alcohol isopropílico. Ejemplos del promotor a ser utilizado para mejorar la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa incluyen el promotor GAPDH procedente de *Escherichia coli* descrito anteriormente.

La actividad de esas enzimas en la presente invención puede ser proporcionada introduciendo la actividad enzimática desde el exterior de la célula bacteriana en el interior de la célula bacteriana, o mediante una elevada expresión de los genes de las enzimas que la bacteria hospedadora tiene en su genoma, mediante la mejora de la actividad del promotor de los genes de las enzimas o la sustitución por otro promotor.

La introducción de la actividad enzimática puede ser realizada, por ejemplo, introduciendo los genes que codifican los cuatro tipos de enzimas desde el exterior de la célula bacteriana de la bacteria hospedadora a el interior de la célula bacteriana utilizando una técnica de recombinación genética. Aquí, los genes de las enzimas a ser introducidos pueden ser conespecíficos o heteroespecíficos con la célula hospedadora. Los métodos para la preparación del ADN genómico necesario para la introducción de genes desde el exterior de la célula bacteriana a el interior de la célula, el corte y ligamiento de ADN, la transformación, PCR (reacción en cadena de la Polimerasa), el diseño y la síntesis de oligonucleótidos utilizados como cebadores, y similares, pueden realizarse mediante métodos habituales bien conocidos para los expertos en el arte. Esos métodos se describen en, por ejemplo, Sambrook, J., et. al., "Molecular Cloning A laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).

El alcance del término “conferir” o “mejora” de la habilidad tal como se utiliza en la presente invención incluye la introducción de un gen que codifica una enzima desde el exterior de la célula bacteriana de la bacteria hospedadora al interior de la célula bacteriana, y además incluye una expresión elevada del gen de una enzima mediante la mejora de la actividad del promotor de un gen de la enzima que la bacteria hospedadora posee en el genoma de la misma, o mediante la sustitución por otro promotor.

En la presente invención, la *Escherichia coli* a la que se ha conferido la actividad enzimática hace referencia a una *Escherichia coli* a la que ha sido conferida la actividad enzimática desde el exterior de la célula bacteriana hacia el interior de la célula bacteriana utilizando un método determinado. Una *Escherichia coli* de este tipo puede ser producida utilizando un método de, por ejemplo, introducción de un gen que codifica la enzima y proteína desde el exterior de la célula bacteriana hacia el interior de la célula bacteriana utilizando la técnica de recombinación genética tal como se describe anteriormente.

En la presente invención, *Escherichia coli*, de la cual se mejora la actividad enzimática, hace referencia a una *Escherichia coli* de la cual se mejora la actividad enzimática mediante un método determinado. Una *Escherichia coli* de este tipo puede ser producida utilizando un método de, por ejemplo, introducción de un gen que codifica la enzima y la proteína desde el exterior de la célula bacteriana hacia el interior de la célula bacteriana utilizando un plásmido y utilizando la técnica de recombinación genética tal como se describe anteriormente, u ocasionando expresiones elevadas de un gen de la enzima que la *Escherichia coli* hospedadora posee en el genoma de la misma mediante la mejora de la actividad del promotor del gen de la enzima o su sustitución por otro promotor.

En la presente invención, *Escherichia coli* significa *Escherichia coli* que puede ser realizada para tener la habilidad para producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de las plantas utilizando un medio determinado, independientemente de si la *Escherichia coli* tiene o no originalmente la habilidad para producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas.

Aquí, la *Escherichia coli* en la que los respectivos genes se van a introducir puede no tener la habilidad de producción de alcohol isopropílico, y puede ser cualquier *Escherichia coli* que permita la introducción o modificación de los respectivos genes.

La *Escherichia coli* puede ser, más preferiblemente, una *Escherichia coli* a la que se ha conferido por adelantado la habilidad de la producción de alcohol isopropílico. Utilizando una *Escherichia coli* de este tipo, puede producirse alcohol isopropílico de una manera más eficaz. Especialmente, de acuerdo con la presente invención, la habilidad de asimilación de sacarosa puede ser conferida a la *Escherichia coli* que no tiene la habilidad innata de asimilación de sacarosa, por lo que puede producirse alcohol isopropílico de manera eficaz a partir de sacarosa. Ejemplos de *Escherichia coli* que no tiene la habilidad innata de asimilación de sacarosa incluyen la cepa k12, cepa B, cepa C, y cepas obtenidas a partir de las mismas.

Un ejemplo de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de ese tipo es una bacteria productora de alcohol isopropílico a la que se ha conferido actividad acetoacetato descarboxilasa, actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, actividad CoA transferasa, y actividad tiolasa para que sea capaz de producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas, y que se describe en la publicación WO 2009/008377.

Un método para producir alcohol isopropílico de acuerdo con la presente invención incluye producir alcohol isopropílico a partir de una materia prima procedente de plantas que contiene sacarosa utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico descrita anteriormente. Más específicamente, el método incluye un proceso en el que la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico descrita anteriormente se pone en contacto con una materia prima procedente de plantas que contienen sacarosa y se cultiva, y un proceso de recogida en el cual se recoge el alcohol isopropílico generado como resultado del contacto.

La materia prima procedente de plantas en el método de producción de alcohol isopropílico descrito anteriormente puede ser, sin una limitación en particular, cualquier materia prima procedente de plantas que contenga sacarosa que sea una fuente de carbono obtenida a partir de una planta. En la presente invención, materia prima procedente de plantas hace referencia a órganos tales como raíces, cañas, tallos, ramas, hojas, flores, y semillas, organismos vegetales que incluyen órganos vegetales, y productos de descomposición de los órganos vegetales, y además abarca fuentes de carbono que pueden ser utilizadas como fuentes de carbono por microorganismos durante su cultivo de entre las fuentes de carbono obtenidas de los organismos vegetales, órganos vegetales, o productos de descomposición de los mismos.

Las fuentes de carbono incluidas en tales materias primas procedentes de plantas incluyen en general, además de sacarosa, azúcares tales como almidón, glucosa, fructosa, xilosa, y arabinosa, o productos de descomposición de plantas herbáceas o leñosas o hidrolizados de celulosa, cada uno de los cuales contiene los ingredientes anteriores en grandes cantidades, y combinaciones de las mismas. Las fuentes de carbono en la presente invención pueden además incluir glicerina o ácidos grasos procedentes de aceites vegetales.

Ejemplos preferibles de materias primas procedentes de plantas en la presente invención incluyen productos agrícolas tales como grano, maíz, arroz, trigo, habas de soja, caña de azúcar, remolacha, algodón, y similares, o combinaciones de las mismas. La forma de las mismas como materia prima no está específicamente limitada, y puede ser un producto crudo, jugo exprimido, un producto triturado, o similar. De manera alternativa, la materia prima procedente de plantas puede encontrarse en una forma que consiste en únicamente la fuente de carbono.

En el proceso de cultivo, el contacto entre la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico y una materia prima procedente de plantas se realiza generalmente cultivando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en un medio de cultivo que contiene la materia prima procedente de plantas.

La densidad de contacto entre la materia prima procedente de plantas y la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico puede modificarse dependiendo de la actividad de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico. En general, la concentración de materia prima procedente de plantas en el medio de cultivo puede ser tal que la concentración inicial de azúcar en términos de glucosa puede estar establecida en un 20% en peso o menos en relación a la masa total de la mezcla. Desde el punto de vista de la tolerancia al azúcar de la *Escherichia coli*, la concentración inicial de azúcar se establece preferiblemente en un 15% en peso o inferior. Otros componentes pueden ser añadidos en cantidades de adición habituales para medios de cultivo de microorganismos, sin una limitación en particular.

El contenido de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en el medio de cultivo puede modificarse con el tipo y actividad de *Escherichia coli*, y la cantidad de un líquido bacteriano de pre-cultivo a ser añadido cuando comienza el cultivo puede establecerse generalmente desde un 0,1 a un 30% en peso en relación al líquido de cultivo, y se establece preferiblemente desde un 1 a un 10% en peso en relación al líquido de cultivo, desde el punto de vista de control de las condiciones de cultivo.

El medio de cultivo a ser utilizado para el cultivo de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico puede ser cualquier medio de cultivo que incluya una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos, y elementos traza orgánicos, ácidos nucleicos, vitaminas y similares requeridas por los microorganismos para producir alcohol isopropílico, sin una limitación en particular.

Además de la sacarosa, azúcares tales como glucosa, fructosa, y melazas, ácidos orgánicos tales como ácido fumárico, ácido cítrico y ácido succínico, y alcoholes tales como metanol, etanol y glicerol, y similares se utilizan como fuentes de carbono, según sea adecuado. Un ion de magnesio, un ion de fosfato, un ion de potasio, un ion de hierro, un ion de magnesio, y similares se utilizan como iones inorgánicos, según sea apropiado, de acuerdo a la necesidad.

Vitaminas, aminoácidos, y similares, y extractos de levadura, peptona, extracto soluble de maíz, productos de descomposición de caseína, y otros, que contienen vitaminas y aminoácidos, se utilizan como elementos traza orgánicos, según sea apropiado.

El medio de cultivo puede incluir otros componentes aditivos, tales como antibióticos, que se añaden habitualmente a los medios de cultivo de microorganismos, en cantidades utilizadas habitualmente. Se prefiere añadir una cantidad apropiada de un agente antiespumante para suprimir la formación de espuma durante la reacción. Las cantidades de estos componentes en el medio de cultivo no están particularmente limitadas, siempre que las cantidades se encuentren dentro de rangos aplicados habitualmente al cultivo de *Escherichia coli*.

El medio de cultivo a ser utilizado en la presente invención es preferiblemente un medio líquido, en consideración de su aplicación a la producción industrial.

En el presente método, el alcohol isopropílico se recoge preferiblemente en un estado disuelto en una solución de la mezcla del medio de cultivo y la materia prima procedente de plantas, o en el estado de estar disuelto en una solución separadora, desde el punto de vista de la relación de separación y recogida. La solución separadora puede ser, por ejemplo, un disolvente orgánico tal como tolueno o dimetil formamida, o agua. Entre ellos, la solución separadora es preferiblemente agua, con la que los contaminantes volátiles generados como subproductos durante la producción de alcohol isopropílico y el alcohol isopropílico pueden ser fácilmente separados. Ejemplos del método de recogida incluyen el método descrito en la publicación WO 2009/008377.

Un ejemplo de aparatos aplicables al método de producción de alcohol isopropílico, en el que el alcohol isopropílico puede ser recogido en un estado disuelto en la solución separadora o en la mezcla es el aparato de producción que se muestra en la Figura 1 de la publicación WO 2009/008377.

En el aparato de producción, una tubería de inyección para inyectar un gas desde el exterior del aparato se conecta a un tanque de cultivo que contiene el medio de cultivo que incluye la bacteria productora de alcohol isopropílico y la materia prima procedente de plantas, permitiendo por tanto la aeración del medio de cultivo.

Un tanque de separación que contiene una solución separadora está conectado al tanque de cultivo a través de una tubería de conexión. Un gas o un líquido que se ha desplazado al tanque separador, entra en contacto con la solución separadora, y tiene lugar un burbujeo.

- 5 Como resultado, el alcohol isopropílico, que ha sido producido en el tanque de cultivo mediante cultivo bajo aeración, se evapora debido a la aeración, y por tanto se separa fácilmente del medio de cultivo, y se separa en la solución separadora en el tanque de separación. Como resultado, el alcohol isopropílico puede ser producido en un estado más purificado de una forma simple y continua.

Ejemplos

- 10 De aquí en adelante, se describen los ejemplos de la presente invención, pero la invención no está limitada a los mismos. En la descripción, el "%" se basa en el peso a menos que se especifique de otro modo.

[Ejemplo 1]

- 15 (Construcción del Vector de expresión para el gen de tiolasa procedente de *Escherichia coli*, gen de la CoA transferasa procedente de *Escherichia coli*, gen de acetoacetato descarboxilasa procedente de una bacteria del género *Clostridium*, alcohol isopropílico deshidrogenasa procedente de una bacteria del género *Clostridium*, y gen de Invertasa procedente de *Escherichia coli* 0157, y Transformante con el Vector de expresión)

- 20 Las secuencias de aminoácidos de la tiolasa de *Escherichia coli* y la CoA transferasa de *Escherichia coli*, y las secuencias de base de las mismas han sido descritas. Específicamente, el gen que codifica la tiolasa se describe en la secuenciación del genoma de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* de 2324131 a 2325315, registrada con el número de acceso de GenBank U00096. Además, el gen que codifica la CoA transferasa se describe en la secuenciación del genoma de la cepa de *Escherichia coli* MG1655 mencionada anteriormente.

La secuencia promotora de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa procedente de *Escherichia coli* (de aquí en adelante denominada en ocasiones como GAPDH), que se describe en 397 a 440 en la información de la secuencia de bases del número de acceso de GenBank X02662, puede ser utilizada como la secuencia de base de un promotor necesario para expresar los genes.

- 25 Para obtener el promotor GAPDH, se realizó amplificación mediante un método por PCR, utilizando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como plantilla y utilizando cgagctacatgcaatgattgacacgattccg (SEQ ID NO: 1) y cgcgcgcatgctattgttagtgaataaaagg (SEQ ID NO: 2). El fragmento de ADN resultante se digirió con enzimas de restricción NdeI y SphI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 100 pb correspondiente al promotor GAPDH. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión de un plásmido pBR322 (número de acceso de GenBank J01749) con enzimas de restricción NdeI y SphI, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando ligasa. Después de esto, se transformó una célula competente de la cepa DH5a de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. La colonia obtenida se cultivó durante la noche a 37°C en un medio líquido LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina, se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el promotor GAPDH se introdujo de forma adecuada. El plásmido se denominó pBRgapP.

- 40 Para obtener el gen de la alcohol isopropílico deshidrogenasa, se realizó amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de NRRL B-593 *Clostridium beijerinckii* como plantilla y utilizando aatatgcatgctggtggaacatatgaaaggtttgcaatgctagg (SEQ ID NO: 3) y gcggatccggtacctataataactactgctttaattaagtc (SEQ ID NO: 4). El fragmento de ADN resultante fue digerido con enzimas de restricción SphI y BamHI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de alcohol isopropílico deshidrogenasa de aproximadamente 1,1 kpb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión de pBRgapP preparado previamente con enzimas de restricción SphI y BamHI, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Después de esto, se transformó una célula competente de la cepa DH5a de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron durante la noche a 37 °C en un medio líquido LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina, se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que la alcohol isopropílico deshidrogenasa se introdujo de forma adecuada. El plásmido se denominó pGAP-IPAdh.

- 50 Para obtener el gen de tiolasa procedente de *Escherichia coli*, se realizó amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como plantilla y utilizando atggatccgctggtggaacatatgaaaaattgtgtcatcgtcag (SEQ ID NO: 5) y gcagaagcttgctagattaattcaaccgttcaatcaccatc (SEQ ID NO: 6). El fragmento de ADN resultante fue digerido con enzimas de restricción BamHI y HindIII, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de tiolasa de aproximadamente 1,2 kpb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión del plásmido pGAP-IPAdh preparado previamente con enzimas de

restricción BamHI y HindIII, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Después de esto, se transformó una célula competente de la cepa DH5a de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron durante la noche a 37 °C en un medio líquido LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina, se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el gen de la tiolasa se introdujo de forma adecuada. El plásmido se denominó pGAP-IPAdh-atoB.

Para obtener un gen de la subunidad α de la CoA transferasa procedente de *Escherichia coli*, se realizó amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como plantilla y utilizando gctctagagctggtggaacatatgaaacaaaattgatgacattacaagac (SEQ ID NO: 7) y tagcaagcttctactcgagttattgctctcgtgaaacg (SEQ ID NO: 8). El fragmento de ADN resultante fue digerido con enzimas de restricción XbaI y HindIII, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la subunidad α de la CoA transferasa de aproximadamente 600 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión del plásmido pGAP-IPAdh-atoB preparado previamente con enzimas de restricción XbaI y HindIII, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Después de esto, se transformó una célula competente de la cepa DH5a de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron durante la noche a 37 °C en un medio líquido LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina, se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el gen de la subunidad α de la CoA transferasa se introdujo de forma adecuada. El plásmido se denominó pGAP-IPAdh-atoB-atoD.

Adicionalmente, para obtener un gen de la subunidad β de la CoA transferasa procedente de *Escherichia coli*, se realizó amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como plantilla y utilizando aagtcctcgagctggtggaacatatggatgcaacaacgtattg (SEQ ID NO: 9) y ggccaagcttcataaatcaccctgtgc (SEQ ID NO: 10). El fragmento de ADN resultante fue digerido con enzimas de restricción XhoI y HindIII, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de la subunidad β de la CoA transferasa de aproximadamente 600 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión del plásmido pGAP-IPAdh-atoB-atoD preparado previamente con enzimas de restricción XhoI y HindIII, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Después de esto, se transformó una célula competente de la cepa DH5a de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron durante la noche a 37 °C en un medio líquido LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina, se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el gen de la subunidad β de la CoA transferasa se introdujo de forma adecuada. El plásmido se denominó pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA.

Adicionalmente, para obtener el cscA procedente de la cepa 0157 de *Escherichia coli*, se realizó amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de la cepa 0157 de *Escherichia coli* como plantilla y utilizando gctggtggaacatatgacgcaatctcgattgcatg (SEQ ID NO: 11) y ttaaccagtgccagagtg (SEQ ID NO: 12). El fragmento de ADN resultante se fosforiló en su terminal utilizando T4 polinucleótido quinasa, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de cscA de aproximadamente 1470 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión de pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA con una enzima de restricción HindIII, seguido de su conversión a extremos romos (blunt ends) utilizando T4 ADN polimerasa, y la desfosforilación de los terminales con fosfatasa alcalina. Los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Se transformó una célula competente de la cepa DH5a de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el extremo 3' del gen de la subunidad β de la CoA transferasa se ligó al extremo 5' de cscA, y que se introdujo el cscA de forma adecuada. El plásmido se denominó pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA-cscA.

El genoma de la *Escherichia coli* O157 está disponible del Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (IRMM por sus siglas en inglés).

Para obtener un gen de acetoacetato descarboxilasa, se realizó amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 como plantilla y utilizando caggtagcctggtggaacatatgttaaaggatgaagtaattaacaaattagc (SEQ ID NO: 13) y gcggatccttacttaagataatcatatataacttcagc (SEQ ID NO: 14). El fragmento de ADN resultante fue digerido con enzimas de restricción KpnI y BamHI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de acetoacetato descarboxilasa de aproximadamente 700 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión del plásmido pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA-cscA preparado previamente con enzimas de restricción KpnI y BamHI, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Después de esto, se transformó una célula competente de la cepa DH5a de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron durante la noche a 37 °C en un medio líquido LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina, se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el gen de la acetoacetato descarboxilasa se introdujo de forma adecuada. El plásmido se denominó pGAP-laaa-cscA. La cepa B de

Escherichia coli (ATCC11303) se transformó con el plásmido, y fue cultivado durante la noche a 37 °C en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. El transformante resultante se denominó cepa pGAP-laaa-cscA/B.

[Ejemplo 2]

(Producción de alcohol isopropílico a partir de sacarosa mediante una cepa pGAP-laaa-cscA/B de *Escherichia coli* utilizando un tanque de cultivo de 3 L)

En este ejemplo, se produjo alcohol isopropílico utilizando un aparato de producción mostrado en la Figura 1 de la publicación WO 2009/008377. El tanque de cultivo utilizado fue un tanque con una capacidad de 3 L y el tanque de separación utilizado fue un tanque con una capacidad de 10 L. El tanque de cultivo, el tanque de separación, la tubería de inyección, la tubería de conexión, y la tubería de descarga estaban todos realizados en cristal. Al interior del tanque de separación, se inyectó agua como solución separadora (agua de separación) en una cantidad de 6 L. El tanque de cultivo estaba equipado con un tubo de drenaje, y el líquido de cultivo incrementado por la alimentación de azúcar y un neutralizador se descargó al exterior del tanque de cultivo, según resultó apropiado.

Como pre-cultivo, la cepa pGAP-laaa-cscA/B obtenida en el Ejemplo 1 fue inoculada en un matraz de Erlenmeyer con una capacidad de 100 mL y con un contenido de 25 mL de un caldo LB, líquido de cultivo Miller (Difco 244620) que contenía 50 µg/mL de ampicilina, y se cultivó durante la noche a una temperatura de cultivo de 35°C, mientras se agitaba a 120 rpm. La cantidad total del líquido de cultivo fue transferida a un tanque de cultivo con una capacidad de 3 L (aparato de cultivo BMJ-01 fabricado por ABLE Co., Ltd.) y con un contenido de 1475 g de un medio de cultivo con la siguiente composición, y fue cultivado.

El cultivo se realizó a una cantidad de aeración de 1,5 L/min, una velocidad de agitación de 550 rpm, una temperatura de cultivo de 35 °C, y un pH de 7,0 (ajustado con una solución de NH₃) bajo presión atmosférica. Se añadió una solución acuosa de sacarosa al 40% peso/peso a una velocidad del caudal de 5g/L/hora durante el periodo del inicio del cultivo hasta 8 horas después del inicio del cultivo, y, después de eso, se llevó a cabo la adición de una solución acuosa de sacarosa al 40% peso/peso a una velocidad de caudal de 15 g/L/hora. Se tomó una muestra del líquido de cultivo de la bacteria 48 horas después del inicio del cultivo, y las células bacterianas se eliminaron mediante una operación centrífuga. Después de eso, la cantidad de alcohol isopropílico acumulada en el sobrenadante del cultivo resultante se midió mediante HPLC de acuerdo con un método habitual.

(Composición del medio de cultivo)

Extracto soluble de maíz (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.): 20 g/L Fe₂SO₄·7H₂O: 0,09 g/L

K₂HPO₄: 2 g/L

KH₂PO₄: 2 g/L

MgSO₄·7H₂O: 2 g/L

(NH₄)₂ SO₄: 2 g/L

ADECANOL LG126 (Adeka Corporation): 0,6 g/L

(El resto: agua)

Como resultado, a las 48 horas después del inicio del cultivo, se confirmó una acumulación de 5,9 g/L de alcohol isopropílico. El valor medido es una suma de las cantidades en el líquido de cultivo y el agua de separación (6 L) después del cultivo.

Los resultados demostraron que la introducción de cscA de entre el grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa dio como resultado la descomposición de la sacarosa, y la glucosa y fructosa, que son productos de descomposición, fueron incorporadas rápidamente a las células, y convertidas en alcohol isopropílico.

[Ejemplo 3]

La producción de alcohol isopropílico a partir de la sacarosa se sometió a prueba en un caso en el que las expresiones de los genes de la CoA transferasa (atoD y atoA) y un gen de tiolasa (atoB) en el genoma de la *Escherichia coli* hospedadora fueron mejoradas mientras que el tamaño del ADN de la longitud total del plásmido se redujo mediante ligamiento únicamente de un gen de acetoacetato descarboxilasa, un gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa, y cscA al vector plasmídico a ser introducido.

(Reemplazo de un promotor *atoD* en el genoma de la cepa B de *Escherichia coli* por un promotor GAPDH)

La secuencia de base total del ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* es conocida (número de acceso de GenBank U00096), y la secuencia de base de un gen (de aquí en adelante abreviado en ocasiones como *atoD*) que codifica una subunidad α de la CoA transferasa de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* ha sido también descrita. Específicamente, *atoD* se describe en 2321469 a 2322131 de la secuencia del genoma de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* registrada con el número de acceso de GenBank U00096.

La secuencia promotora de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa procedente de *Escherichia coli* (de aquí en adelante denominada en ocasiones como GAPDH), que se describe en 397 a 440 en la información de la secuencia de base del número de acceso de GenBank X02662, puede ser utilizada como la secuencia de base de un promotor necesario para expresar los genes. Para obtener el promotor GAPDH, se realizó amplificación mediante un método por PCR, utilizando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como plantilla y utilizando *cgctcaattgcaatgattgacacgattccg* (SEQ ID NO: 15) y *acagaattcgctattgttagtaataaaagg* (SEQ ID NO: 16). El fragmento de ADN resultante fue digerido con enzimas de restricción *MfeI* y *EcoRI*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 100 pb que codifica un promotor GAPDH. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión de un plásmido pUC 19 (número de acceso de GenBank X02514) con la enzima de restricción *EcoRI* seguido de tratamiento con fosfatasa alcalina, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Después de eso, se transformó una célula competente de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/mL de ampicilina. Diez de las colonias obtenidas se cultivaron individualmente durante la noche a 37 °C en un medio líquido LB que contenía 50 μ g/mL de ampicilina, se recuperaron plásmidos, y se seleccionaron plásmidos a partir de los cuales el promotor GAPDH no se cortó cuando fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*. Además, las secuencias de ADN del mismo se revisaron, y en el que se introdujo de manera adecuada un plásmido con el promotor GAPDH se denominó pUCgapP. El pUCgapP obtenido fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*.

Adicionalmente, para obtener un *atoD*, se realizó amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como plantilla y utilizando *cgaattcgctggtggaacatagaaaacaaaattgatgacattacaagac* (SEQ ID NO: 17) y *gcggtaccttattgctctcctgtgaaacg* (SEQ ID NO: 18). El fragmento de ADN resultante fue digerido con enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de *atoD* de aproximadamente 690 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con el pUCgapP, que había sido previamente digerido con enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Después de esto, se transformó una célula competente de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 μ g/mL de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el *atoD* se introdujo de forma adecuada. El plásmido se denominó pGAPatoD.

La cepa MG1655 de *Escherichia coli* está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection).

Tal como se describe anteriormente, la secuencia de base de *atoD* en el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* también ha sido descrita. Se realizó PCR utilizando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como plantilla, y utilizando *gtcttagatgctgaaatccactagtctgtgc* (SEQ ID NO: 19) y *tactgcagcgttccagcaccttatcaacc* (SEQ ID NO: 20), preparada en base a la información génica de una región cercana a 5' de *atoD* de la cepa MG1655 de *Escherichia coli*, como resultado de lo cual se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,1 kpb.

Además, se realizó PCR utilizando el vector de expresión pGAPatoD preparado previamente como plantilla y utilizando *ggtctagagcaatgattgacacgattccg* (SEQ ID NO: 21) preparada en base a la información de la secuencia del promotor GAPDH de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* y el cebador de SEQ ID NO: 18 preparado en base a la información de la secuencia de *atoD* de la cepa MG1655 de *Escherichia coli*, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 790 pb con el promotor GAPDH y *atoD*.

Los fragmentos obtenidos anteriormente fueron digeridos con enzimas de restricción *PstI* y *XbaI*, y *XbaI* y *KpnI*, respectivamente. Los fragmentos digeridos se mezclaron con un fragmento obtenido mediante la digestión de un plásmido pTH18cs1 sensible a la temperatura (número de acceso de GenBank AB019610) [Hahimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)] con *PstI* y *KpnI*, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. La cepa DH5 α se transformó con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció a 30°C en una placa de agar LB con un contenido de 10 μ g/ml de cloranfenicol. La colonia obtenida fue cultivada durante la noche a 30°C en una placa de agar LB con un contenido de 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas. La cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) fue transformada con el plásmido obtenido, y fue cultivado durante la noche a 30°C en una placa de agar LB con un contenido de 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se obtuvo un transformante. El transformante obtenido fue inoculado en una placa de agar LB con un contenido de 10

µg/ml de cloranfenicol, y se cultivó durante la noche a 30°C. Las células bacterianas obtenidas se aplicaron en una placa de agar LB con un contenido de 10 µg/ml de cloranfenicol, y se cultivaron a 42°C, y se obtuvieron colonias. Las colonias obtenidas se cultivaron a 30°C durante 2 horas en un medio líquido LB que no contenía antibiótico, y se aplicó en una placa de agar que no contenía antibiótico, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias que crecen a 42°C.

De las colonias resultantes, 100 colonias se recogieron aleatoriamente, cada una de las cuales se cultivó entonces en una placa de agar LB libre de antibióticos y una placa de agar LB con un contenido de 10 µg/ml de cloranfenicol. Se seleccionaron clones sensibles al cloranfenicol, y, de los ADN cromosómicos de los clones seleccionados, se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 790 pb que incluía el promotor GAPDH y *atoD*, y se seleccionó una cepa en la que una región promotora *atoD* fue reemplazada por el promotor GAPDH. Entonces, un clon que cumplía las anteriores condiciones se denominó una cepa insertada con el genoma GAPp-*atoD* con el *atoD* eliminado de la cepa B de *Escherichia coli*.

La cepa B de B de *Escherichia coli* (ATCC 11303) se encuentra disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection), que es un banco de células, microorganismos, y genes.

[Ejemplo 4]

(Construcción del Vector de expresión para el gen de acetoacetato descarboxilasa procedente de una bacteria del género *Clostridium* y el gen del alcohol isopropílico deshidrogenasa procedente de una bacteria del género *Clostridium*, y un transformante con el vector de expresión)

Una acetoacetato descarboxilasa de una bacteria del género *Clostridium* se describe en el número de acceso de GenBank M55392 y una alcohol isopropílico deshidrogenasa de la misma se describe en el número de acceso de GenBank AF157307.

Para obtener el gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa, se realizó una amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 como plantilla y utilizando AATATGCATGCTGGTGGGAACATATGAAAGGTTTTGCAATGCTAGG (SEQ ID NO: 3) y gcggatccttataataactactgctttaattaagtc (SEQ ID NO: 22). El fragmento de ADN resultante fue digerido con enzimas de restricción SphI y BamHI, como resultado de lo cual se obtuvo un alcohol isopropílico deshidrogenasa de aproximadamente 1,1 kpb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión del plásmido pBRgapP previamente preparado con enzimas de restricción SphI y BamHI, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Después de esto, se transformó una célula competente de la cepa DH5α de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. La colonia obtenida se cultivó a 37°C durante la noche en un medio líquido LB con un contenido de 50 µg/mL de ampicilina, y se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el IPAdh se introdujo de forma adecuada. El plásmido se denominó pGAP-IPAdh.

Para obtener el gen de la acetoacetato descarboxilasa, se realizó una amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 como plantilla y utilizando caggatccgctggtggaacatatgttaaaggatgaagtaattaacaaattagc (SEQ ID NO: 23) y ggaattcggtacctaactaagataatcatatataacttcagc (SEQ ID NO: 24). El fragmento de ADN resultante fue digerido con enzimas de restricción BamHI y EcoRI, como resultado de lo cual se obtuvo una acetoacetato descarboxilasa de aproximadamente 700 pb. El fragmento de ADN obtenido se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión del plásmido pGAP-IPAdh previamente preparado con enzimas de restricción BamHI y EcoRI, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Se transformó una célula competente de la cepa DH5α de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. La colonia obtenida se cultivó a 37°C durante la noche en un medio líquido LB con un contenido de 50 µg/mL de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el *adc* se introdujo de forma adecuada. El plásmido se denominó pGAP-*la*.

Una célula competente de una cepa insertada con el genoma GAPp-*atoD* con el *atoD* eliminado de la cepa B de *Escherichia coli* preparada en el Ejemplo 3, se transformó con el plásmido pGAP-*la*, y fue cultivada a 37°C durante la noche en una placa de agar LB con un contenido de 50 µg/mL de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo una cepa insertada con el genoma de pGAP-*la*/GAPp-*atoD* de *Escherichia coli*.

La cepa ATCC824 de *Clostridium acetobutylicum* y la cepa B de *Escherichia coli* se encuentran disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, que es un banco de células, microorganismos, y genes. La NRRL B-593 de *Clostridium beijerinckii* está disponible de la Colección de cultivos VTT, que es un banco de células y microorganismos.

[Ejemplo 5]

(Construcción del Vector de expresión del gen de acetoacetato descarboxilasa procedente de una bacteria del género *Clostridium*, del gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa procedente de una bacteria del género *Clostridium*, y del gen de Invertasa procedente de *Escherichia Coli* 0157, y un transformante con el vector de expresión)

La secuencia de base total del ADN genómico de la cepa O157 de *Escherichia Coli* se conoce (número de acceso de GenBank AE005174), y la secuencia de base de un gen (de aquí en adelante abreviado en ocasiones como cscA) que codifica la invertasa de la cepa O157 de *Escherichia Coli* ha sido también descrita. Específicamente, el cscA se describe en 3274383 a 3275816 de la secuencia del genoma de la cepa O157 de *Escherichia Coli* registrada con el número de acceso de GenBank AE005174.

Para obtener cscA, se realizó una amplificación mediante un método por PCR utilizando el ADN genómico de la cepa O157 de *Escherichia Coli* como plantilla y utilizando ATGGTACCGCTGGTGGAAACATATGACGCAATCTCGATTGCATG (SEQ ID NO: 25) y CGAATTCTTAACCCAGTTGCCAGAGTGC (SEQ ID NO: 26). El fragmento de ADN resultante fue digerido con las enzimas de restricción KpnI y EcoRI, como resultado de lo cual se obtuvo un fragmento de cscA de aproximadamente 1470 pb. El fragmento de ADN se mezcló con un fragmento obtenido mediante la digestión del pGAP-la, que había sido previamente preparado en el Ejemplo 4 (el vector de expresión para el gen de acetoacetato descarboxilasa procedente de la bacteria del género *Clostridium* y el gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa procedente de la bacteria del género *Clostridium*), con enzimas de restricción KpnI y EcoRI, y los fragmentos mezclados se ligaron utilizando una ligasa. Después de eso, se transformó una célula competente de la cepa DH5α de *Escherichia coli* (ADN-903: Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligamiento, y se obtuvo un transformante que creció en una placa de agar LB que contenía 50 µg/mL de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó que el cscA se introdujo de forma adecuada. Este plásmido se denominó pGAP-la-cscA.

Una célula competente de la cepa insertada con el genoma GAPp-atoD con el ato-D eliminado de la cepa B de *Escherichia coli* preparada en el Ejemplo 3, se transformó con el plásmido pGAP-la-cscA, y se cultivó a 37°C durante la noche en una placa de agar LB con un contenido de 50 µg/mL de ampicilina, como resultado de lo cual se obtuvo una cepa insertada con el genoma de pGAP-la-cscA/GAPp-atoD de *Escherichia coli*.

El genoma de la *Escherichia coli* 0157 está disponible del Instituto de Materiales y Medidas de Referencia.

[Ejemplo 6]

(Producción de Alcohol isopropílico a partir de sacarosa mediante una cepa insertada con el genoma de pGAP-la-cscA/GAPp-atoD de *Escherichia coli*, utilizando un tanque de cultivo de 3 L)

Utilizando la cepa insertada con el genoma de pGAP-la-cscA/GAPp-atoD de *Escherichia coli* obtenida en el Ejemplo 5, la producción de alcohol isopropílico fue examinada en la misma forma que en el Ejemplo 2.

Además, se midieron las cantidades de sacarosa, glucosa, y fructosa acumuladas en el tanque de cultivo, y los resultados se muestran en la Tabla 1.

Como resultado, 48 horas después del inicio del cultivo, se observó una acumulación de 31,4 g/L de alcohol isopropílico. Cada uno de los valores medidos es una suma de las cantidades en el líquido de cultivo y el agua de separación después del cultivo.

[Tabla 1]

Tiempo hr	Cantidad añadida de 40% de sacarosa g	Azúcar residual			Cantidad de acumulación de alcohol isopropílico g/L
		Sacarosa g/L	Glucosa g/L	Fructosa g/L	
0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
3	23,6	22,07	0,00	0,00	0,00
6	67,2	46,05	0,02	0,03	0,43
10	152,1	78,28	0,76	0,00	6,43

24	384,6	0,00	0,00	0,00	11,87
30	536,0	0,00	0,00	0,00	18,28
48	1011,9	0,00	0,00	0,00	31,38

Los resultados demostraron que, cuando se seleccionaron los genes procedentes de una bacteria/bacterias del género *Clostridium* para la actividad acetoacetato descarboxilasa y la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, y estos genes se introducen únicamente con cscA de entre el grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa, la sacarosa se descompone, y se incorporan rápidamente la glucosa y la fructosa como productos de descomposición a las células, y se convierten en alcohol isopropílico. Además, en los resultados, aunque la glucosa y la fructosa deben haber sido producidas en cantidades equimolares por la descomposición de la sacarosa, la fructosa no se acumuló en el medio de cultivo, y se observó que se producía alcohol isopropílico de manera eficaz sin que se vea afectado por la represión catabólica por parte de la glucosa.

10 [Ejemplo 7]

(Producción de Alcohol isopropílico a partir de Melaza por la cepa insertada con el genoma de pGAP-la-cscA/GAPp-atoD de *Escherichia coli*, utilizando un tanque de cultivo de 1 L)

La producción de alcohol isopropílico se sometió a prueba de la misma manera que en el Ejemplo 6, excepto por utilizar melaza al 80% peso/peso (fabricada por Dai-Nippon Meiji Sugar Co., Ltd.) en lugar del 40% peso/peso de solución acuosa de sacarosa. 48 horas después del inicio del cultivo, se observó una acumulación de alcohol isopropílico de 29,4 g/L. El valor medido es una suma de las cantidades en el líquido de cultivo y el agua de separación después del cultivo.

[Ejemplo comparativo 1]

(Producción de alcohol isopropílico por la cepa insertada con el genoma de pGAP-la/GAPp-atoD de *Escherichia coli*, utilizando un tanque de cultivo de 3L)

El cultivo con alcohol isopropílico se sometió a prueba con respecto a la cepa insertada con el genoma de pGAP-la/GAPp-atoD preparada en el Ejemplo 4, bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 2. Como resultado, la producción de alcohol isopropílico no se confirmó incluso después de 48 horas, y la sacarosa añadida permaneció en el sobrenadante del cultivo en casi la misma cantidad.

Esto demuestra que el alcohol isopropílico no puede ser producido sin la introducción de CscA incluso cuando la habilidad de producción de alcohol isopropílico ha sido conferida.

[Ejemplo comparativo 2]

(Producción de Alcohol isopropílico mediante una cepa pGAP-la-cscA/B de *Escherichia Coli* utilizando un tanque de cultivo de 3 L)

La cepa B de *Escherichia Coli* (ATCC11303) se transformó con el plásmido pGAP-la-cscA preparado en el Ejemplo 5, y se cultivó a 37°C durante la noche en una placa de agar LB con un contenido de 50 µg/mL de ampicilina. El transformante resultante se denominó cepa pGAP-la-cscA/B. El cultivo con alcohol isopropílico se sometió a prueba con respecto a la cepa pGAP-lacscA/B preparada, bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 2. En 48 horas no se observó producción de alcohol isopropílico.

Esto demuestra que el alcohol isopropílico no puede ser producido a menos que la habilidad de producción de alcohol isopropílico sea conferida, incluso cuando se introduce solamente CscA en la cepa B de *Escherichia Coli*.

[Ejemplo comparativo 3]

(Confirmación de la represión catabólica por parte de la glucosa en la cepa B de *Escherichia Coli*)

Se confirmó que la cepa B, que es hospedadora de una *Escherichia Coli* productora de alcohol isopropílico según la presente invención, es una *Escherichia Coli* que está intrínsecamente influenciada por la represión catabólica por parte de la glucosa.

Como pre-cultivo, se inoculó la cepa B de *Escherichia Coli* (ATCC11303) en un tubo de plástico con una capacidad de 14 mL (2057 fabricado por FALCON Co., Ltd.) y con un contenido de 5 mL de caldo, líquido de cultivo Miller (Difco 244620), y se cultivó a una temperatura de cultivo de 37°C mientras se agitaba a 120 rpm. Entonces, se transfirió 0,3 mL de líquido de pre-cultivo a cada uno de los matraces con deflectores con una capacidad de 100 mL y con un contenido de 30 mL de medios de cultivo de las composiciones de 1 a 4 mostrada en la Tabla 2, respectivamente, y se cultivó. El cultivo se realizó a una velocidad de agitación de 120 rpm y a una temperatura de cultivo de 37°C.

A las 0, 2, 4, 6, 8, y 10 horas después del inicio del cultivo, se tomaron muestra de los líquidos de cultivo de las células bacterianas, de los cuales se habían eliminado las células bacterianas mediante operación centrífuga. Entonces, se midieron los contenidos de glucosa y fructosa en el sobrenadante del cultivo resultante mediante un Kit F de glucosa/fructosa (número de producto: 139106 fabricado por J.K. International Co., Ltd). La figura 1 muestra los resultados. En la figura 1, los círculos negros representan las cantidades de reducción de glucosa y los círculos blancos representar las cantidades de reducción de fructosa, respectivamente. Además, el grado de reducción de glucosa o fructosa se calculó para cada tiempo de cultivo empezando desde la hora 0 del cultivo. La tabla 2 muestra las cantidades de reducción de glucosa en los respectivos medios después de 10 horas.

[Tabla 2]

	Nº	1	2	3	4
Medio de cultivo M9	NH ₂ Cl ₄ (g/L)	10	10	10	10
	Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O (g/L)	17,1	17,1	17,1	17,1
	KH ₂ PO ₄ (g/L)	3	3	3	3
	NaCl (g/L)	0,5	0,5	0,5	0,5
	MgSO ₄ -7H ₂ O (mg/L)	490	490	490	490
	CaCl ₂ -2H ₂ O (mg/L)	14,7	14,7	14,7	14,7
	FeSO ₄ -7H ₂ O (mg/L)	2,8	2,8	2,8	2,8
	Tiamina-HCl (mg/L)	10	10	10	10
Azúcares	glucosa (g/L)	0	9	18	0
	fructosa (g/L)	0	9	0	18
(El resto: agua)					
Cantidad de reducción de glucosa (g/L)		-	4,4	5,1	-
Cantidad de reducción de fructosa (g/L)		-	1,0	-	3,4

Tal como se muestra en la Tabla 2, cuando se comparan las cantidades de reducción de fructosa y glucosa después de 10 horas, el valor es 3,4 g/L en el caso del medio de cultivo nº 4 del cual la fuente de azúcar incluye únicamente fructosa, mientras que la captación de fructosa se suprime en el case del medio de cultivo nº 2 del cual la fuente de azúcar incluye tanto glucosa como fructosa. Esto confirmó que, cuando la fuente de azúcar es únicamente fructosa, la cepa B incorpora fructosa de forma similar a la incorporación de glucosa, mientras que la incorporación de fructosa en la cepa B se suprime cuando la glucosa y la fructosa coexisten.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse una *Escherichia Coli* productora de alcohol isopropílico y un método para producir alcohol isopropílico que son útiles para una producción eficaz de alcohol isopropílico a partir de sacarosa, que no es costosa y presenta un elevado valor de utilidad industrial.

Lista de secuencias

<110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> Bacteria productora de alcohol isopropílico y método para producir alcohol isopropílico

<130> AJW/FP6815955

<140> EP10817144.8

<141> 2010-09-13
 <150> PCT/JP2010/065770
 <151> 2010-09-13
 <150> JP2009-214694
 5 <151> 2009-09-16
 <160> 26
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 1
 15 cgagctacat atgcaatgat tgacacgatt ccg 33
 <210> 2
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> cebador
 <400> 2
 cgcgcgcatg ctatttgta gtgaataaaa gg 32
 <210> 3
 25 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 3
 aatatgcatg ctggtggaac atatgaaagg tttgcaatg ctagg 45

<210> 4
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 4
 gcggatccgg tacctataa tataactact gctttaatta agtc 44
 <210> 5
 10 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 5
 atggatccgc tgggtgaaca tatgaaaaat tgtgtcatcg tcag 44
 <210> 6
 <211> 42
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 6
 gcagaagctt gtctagatta attcaaccgt tcaatcacca tc 42
 25 <210> 7
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> cebador
 <400> 7

gctctagagc tgggtggaaca tatgaaaaca aaattgatga cattacaaga c 51

<210> 8

<211> 41

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 8

tagcaagctt ctactcgagt tatttgctct cctgtgaaac g 41

10 <210> 9

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 9

aagtctcgag ctggtggaac atatggatgc gaaacaacgt attg 44

<210> 10

<211> 28

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 10

25 ggccaagctt cataaatcac cccgttgc 28

<210> 11

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> cebador

<400> 11
 gctggtggaa catatgacgc aatctcgatt gcatg 35
 <210> 12
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 12
 10 ttaaccagtg tgccagagtg c 21
 <210> 13
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 cagggtaccgc tgggtggaaca tatgttaaag gatgaagtaa ttaacaaat tagc 54
 <210> 14
 20 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 14
 gcggatcctt acttaagata atcatatata acttcagc 38
 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>

<223> cebador
 <400> 15
 cgctcaattg caatgattga cacgattccg 30
 <210> 16
 5 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 16
 acagaattcg ctattgtta gtgaataaaa gg 32
 <210> 17
 <211> 50
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 17
 cgaattcgct ggtggaacat atgaaaacaa aattgatgac attacaagac 50
 20 <210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 18
 gcggtacctt atttgctctc ctgtgaaacg 30
 <210> 19
 <211> 31
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 19
 gctctagatg ctgaaatcca ctagtcttgt c 31
 5 <210> 20
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> cebador
 <400> 20
 tactgcagcg ttccagcacc ttatcaacc 29
 <210> 21
 <211> 29
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 20 ggtctagagc aatgattgac acgattccg 29
 <210> 22
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 22
 gcggatcctt ataataaac tactgcttta attaagtc 38
 <210> 23
 30 <211> 54
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 23
 5 caggatccgc tgggtgaaca tatgttaaag gatgaagtaa ttaacaaat tagc 54
 <210> 24
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <220>
 <221> cebador
 <222> (1)..(24)
 15 <223>
 <400> 24
 ggaattcggg accttactta agataatcat atataacttc agc 43
 <210> 25
 <211> 43
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 25
 25 atggtaccgc tgggtgaaca tatgacgcaa tctcgattgc atg 43
 <210> 26
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador

<400> 26

cgaattctta acccagttgc cagagtgc

28

REIVINDICACIONES

1. *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que comprende al menos un gen de sacarosa hidrolasa que pertenece a un grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa, y un sistema de producción de alcohol isopropílico conferido o mejorado en donde la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico es una *Escherichia coli* a la que se ha conferido actividad acetoacetato descarboxilasa, actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, actividad CoA transferasa, y actividad tiolasa.
2. *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 1, que comprende únicamente el gen de sacarosa hidrolasa de entre los genes que pertenecen al grupo de genes de sistema no PTS de sacarosa.
3. *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 1, en donde la actividad acetoacetato descarboxilasa, la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, la actividad CoA transferasa, y la actividad tiolasa se obtienen mediante la introducción de genes que codifican respectivas enzimas que se obtienen de al menos una seleccionada del grupo que consiste en bacterias del género *Clostridium*, bacterias del género *Bacillus*, y bacterias del género *Escherichia*.
4. *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 1, en donde la actividad acetoacetato descarboxilasa y la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa se obtienen mediante la introducción de genes que codifican respectivas enzimas que se obtienen a partir de una bacteria o bacterias del género *Clostridium*, y la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen mediante la introducción de genes que codifican respectivas enzimas que se obtienen a partir de una bacteria o bacterias del género *Escherichia*.
5. *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 1, en donde la actividad acetoacetato descarboxilasa se obtiene mediante la introducción de un gen que codifica una enzima procedente de *Clostridium acetobutylicum*, la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa se obtiene mediante la introducción de un gen que codifica una enzima procedente de *Clostridium beijerinckii*, y la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen mediante la introducción de genes que codifican respectivas enzimas procedentes de *Escherichia coli*.
6. *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 1, en donde un gen que codifica la acetoacetato descarboxilasa, un gen que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa, y el gen que codifica la sacarosa hidrolasa han sido introducidos utilizando al menos un plásmido, y la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen a partir de genes en la *Escherichia coli* hospedadora.
7. *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 6, en donde un promotor para expresar un gen que codifica la CoA transferasa y un gen que codifica la tiolasa es al menos uno de promotor gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o un promotor serina hidroximetil transferasa.
8. *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 1, en donde la actividad acetoacetato descarboxilasa, la actividad alcohol isopropílico deshidrogenasa, la actividad CoA transferasa y la actividad tiolasa se obtienen todas mediante la introducción de genes que codifican respectivas enzimas procedentes de una bacteria o bacterias del género *Clostridium*.
9. Un método para producir alcohol isopropílico, que comprende producir alcohol isopropílico a partir de materia prima procedente de plantas que contiene sacarosa utilizando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

FIG.1

