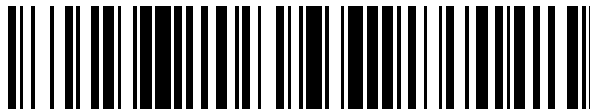


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 958**

21 Número de solicitud: 201431826

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12P 7/16** (2006.01)

**C12R 1/40** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**12.12.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**13.06.2016**

Fecha de la concesión:

**21.03.2017**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**28.03.2017**

73 Titular/es:

**ABENGOA RESEARCH, S.L. (100.0%)  
C/ Energía Solar, 1 Campus Palmas Altas  
41014 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**GÓMEZ GARCÍA, María Rosario;  
CUENCA MARTÍN, María Del Sol;  
UDAONDO DOMÍNGUEZ, Zulema;  
ROCA HERNÁNDEZ, Amalia;  
RAMOS MARTÍN, Juan Luis y  
DUQUE MARTÍN DE OLIVA, María Estrella**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

54 Título: **Bacteria modificada genéticamente deficiente en la asimilación de alcoholes**

57 Resumen:

Bacteria modificada genéticamente deficiente en la asimilación de alcoholes.

La presente invención se refiere a una célula bacteriana genéticamente modificada deficiente en la asimilación de alcoholes como fuente de carbono respecto a la cepa silvestre de la cual proviene. La invención también se relaciona con un método para producir dicha célula y a una composición microbiológica para producir alcoholes. Asimismo, la invención se relaciona con el uso de las células bacterianas modificadas genéticamente o de la composición microbiológica para producir alcoholes así como a un procedimiento para producir alcoholes a partir de dichas células o de dicha composición microbiológica.

ES 2 573 958 B1

## DESCRIPCIÓN

Bacteria modificada genéticamente deficiente en la asimilación de alcoholes

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de los procesos de producción industrial de alcoholes. En particular, la invención se refiere a una célula bacteriana genéticamente modificada que es deficiente respecto a la cepa silvestre de la cual proviene, en la asimilación de alcoholes como fuente de carbono.

10

La presente invención también se relaciona con un método para producir dicha célula bacteriana deficiente en la asimilación de alcoholes y a una composición microbiológica para producir alcoholes basada en la célula bacteriana genéticamente modificada de la invención.

15

Por último, la invención se relaciona con el uso de las células bacterianas de la invención o de la composición microbiológica de la invención para producir alcoholes y en particular, a un procedimiento para producir alcoholes a partir de dichas células o de dicha composición microbiológica.

### 20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La producción de bioalcoholes en procesos industriales de degradación de biomasa se está convirtiendo en una alternativa prometedora para producir combustibles de sustitución de los tradicionales combustibles de origen fósil como la gasolina. Por ejemplo, el butanol ( $C_4H_9OH$ ) se perfila como uno de los alcoholes más prometedores. El butanol es además, un producto interesante en la industria química como un precursor de pinturas, y se usa en la fabricación de polímeros y plásticos. Debido a su naturaleza de alcohol de cuatro carbonos, tiene un mayor contenido energético que otros alcoholes como por ejemplo, el etanol. Actualmente, el butanol se presenta como combustible alternativo a la gasolina por su mayor contenido energético un 40 % superior al de la gasolina y por ser menos corrosivo para los motores.

30

El desarrollo de un proceso económico de conversión de un producto de poco valor como la biomasa hacia otro tipo de productos de alto valor añadido como, por ejemplo, los alcoholes vía transformación química o fermentación, requiere la optimización de varias etapas clave.

35

En especial, una de gran importancia es la de la transformación de los azúcares obtenidos por la degradación de la biomasa hacia alcoholes. Dicha transformación química

puede en principio llevarse a cabo de diferentes formas aunque la más habitual es por fermentación con microorganismos. Algunos de los microorganismos que se han usado hasta la fecha para la producción de alcoholes a partir de biomasa pertenecen a diferentes géneros como, por ejemplo, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Geobacillus*,  
5 *Zymomonas* y también *Pseudomonas*.

Los microorganismos utilizados para la producción de alcoholes deben idealmente poseer una alta capacidad de producción de alcoholes que permita altos rendimientos, así como una alta tolerancia a la toxicidad inherente de los alcoholes producidos. Estos dos  
10 parámetros han determinado precisamente las estrategias usadas en el desarrollo de microorganismos cada vez más eficientes en la producción de alcoholes.

Por un lado, se han llevado a cabo muchos intentos de mejorar la eficiencia de los procesos de producción de alcoholes mediante estrategias dirigidas a aumentar la producción de  
15 alcohol por parte de los microorganismos. Entre estas cabe mencionar aquellas dirigidas a la selección y aislamiento de nuevas cepas productoras de alcoholes [Liu, Xiao-Bo et al. Weishengwuxue Tongbao, 2012, 39(11): 1629-1635] o aquellas dirigidas a inducir mutaciones aleatorias en microorganismos ya productores de alcohol para aislar mutantes que den una mayor producción [Zhang, Lili et al. Zhongguo Niangzao, 2013, 32(5):129-133].  
20 No obstante, el método más efectivo de aumentar la producción es mediante la manipulación genética de los microorganismos para introducirles genes involucrados en las vías sintéticas de diferentes alcoholes o incluso operones que comprenden los genes de rutas sintéticas completas (WO2009122192, WO2009120806, WO2008137406, WO2008137403, WO2008137402).

25 Otros intentos han ido dirigidos a aumentar la tolerancia de los microorganismos frente a los alcoholes. A medida que los microorganismos producen el alcohol deseado aumenta su concentración en el medio lo que hace aumentar la toxicidad sobre los propios microorganismos. Por tanto, otra manera para mejorar el rendimiento de la producción de  
30 alcoholes es aumentar la tolerancia de los microorganismos a los alcoholes.

La búsqueda y aislamiento de nuevos microorganismos con mayor tolerancia a alcoholes es una constante [Ting, Cindy NG Wei et al Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(6): 1672-1680] en el área de la producción de etanol y otros alcoholes de cadena corta.

35

También se han obtenido microorganismos más tolerantes a alcoholes mediante mutagénesis por bombardeo de iones [Liu-Xiao-Bo et al. Journal of Microbiology (Seoul, Republic of Korea), 2012, 50(6); 1024-1028], por irradiación de protones [Jensen, Torjoern Oelshoej et al. AMB express, 2012, 2(1), 44, 7pp] o por mutagénesis combinada por  
5 implantación de haz de iones de baja energía e inducción con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina [Li, Han-Guang et al. Bioresource technology (2013), 137: 254-260] u otro agente mutagénico.

Otra alternativa consiste en mejorar algunas propiedades de las membranas para conseguir  
10 un incremento en la tolerancia. Así, US2011/0195505 describe una estrategia que consiste en proporcionar exógenamente ácidos grasos saturados a bacterias para que estas aumenten la proporción de este tipo de ácidos grasos en sus membranas celulares. Este aumento en la proporción de ácidos grasos saturados en las membranas celulares protege a las bacterias y las hace más tolerantes a los alcoholes.

15 Algunas estrategias han desarrollado ingeniería de factores de transcripción para obtener el fenotipo deseado de una cepa super tolerante. Estos factores de transcripción se generan mediante técnicas clásicas como la reacción en cadena de la polimerasa propensa a errores. Lee y colaboradores [Lee, Ju-Young et al Biotechnology and Bioengineering (2011),  
20 108(4): 742-749] crearon librerías de factores de transcripción artificiales (ATFs) fusionados a la proteína receptora de AMP cíclico con el objetivo de manipular el perfil transcripcional y poder ligarlo a un fenotipo de tolerancia. Los autores obtuvieron una tolerancia aumentada del 1,5 % (v/v) de butanol en *E. coli* y caracterizaron algunos de los genes ligados a dicha tolerancia como *sdhCDAB*, *flu*, *ybgD*, *yglpC*.

25 Una última estrategia consiste en el uso de bombas de eflujo para la expulsión activa de los alcoholes del interior de las células productoras para reducir así la toxicidad en el interior de las células y aumentar la tolerancia. En concreto, se ha descrito la manipulación de la bomba AcrA de *E.coli* para mejorar la tolerancia a alcoholes de cadena corta [Fisher M.A. et  
30 al. ACS Synthetic Biology, 2014, 3:30-40]. Otra bomba de eflujo cuya utilidad frente a diferentes disolventes incluidos alcoholes ha sido demostrada es la bomba SrpABC de *Pseudomonas putida* S12 [Kieboom J. et al.The journal of Biological Chemistry, 1998, Vol.273 (2): 85-91]. El documento US 2011/0294183 describe diferentes cepas bacterianas modificadas genéticamente para la expresión heteróloga de diferentes bombas de eflujo con  
35 el fin de proporcionar tolerancia frente a diferentes compuestos tóxicos como como biofuel,

biogasolina, biodiesel, biojet-fuel u otros compuestos como geranil acetato, geraniol,  $\alpha$ -pineno, limoneno o farnesil hexanoato.

Ahora, los autores de la presente invención han desarrollado una nueva estrategia para mejorar el rendimiento en la producción de alcoholes y, de manera especial en la producción de butanol. Esta estrategia consiste en disminuir la capacidad de asimilación de alcoholes por parte de los microorganismos. Muchos microorganismos utilizan los alcoholes como fuente de carbono y, por ello, disminuyendo la capacidad de asimilación de alcoholes por parte de dichos microorganismos se pueden conseguir rendimientos de producción más altos. Los inventores han descubierto que la mutación en una serie de genes proporciona bacterias mutantes con una capacidad disminuida para la asimilación de alcoholes en comparación con las cepas de cuales provienen.

#### **OBJETO DE LA INVENCION**

Por tanto, es el objeto principal de la presente invención, una célula bacteriana genéticamente modificada caracterizada porque presenta una expresión reducida de al menos uno de los siguientes genes:

- a) gen *glcB* de la malato sintasa G,
- b) gen *aceA* de la isocitrato liasa,
- c) gen *gluQ* de la glutamil-Q tRNA(Asp) sintetasa,
- d) gen *rpoZ* de la subunidad  $\omega$  de la RNA polimerasa o
- e) gen *dusB* de la t-RNA dihidrouridina sintasa B, o
- f) de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5,

donde dicha expresión reducida le proporciona a la célula una asimilación deficiente de alcoholes como fuente de carbono. En adelante nos referiremos a dicha célula bacteriana como célula de la invención.

Otro objeto adicional de la invención es un método para producir dicha célula o células con asimilación deficiente de alcoholes.

Es también un objeto de la invención, una composición microbiológica para producir alcoholes que comprende las células con asimilación deficiente de alcoholes de la invención y al menos un elemento adicional que favorezca la producción de alcoholes (en adelante composición de la invención).

Asimismo, es objeto de la invención el uso de una célula de acuerdo con la invención o una composición de acuerdo con la invención para la producción de alcoholes.

Un último objeto de la presente invención es un procedimiento para producir alcoholes mediante el uso de las células de la invención o de la composición de la invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Crecimiento en medio mínimo con butanol 0,3% como única fuente de carbono. **1A.** Crecimiento de *Pseudomonas putida* BIRD-1, cepa Silvestre (B1) y cepa mutada en el gen *glcB* (*GlcB*). **1B.** Crecimiento de *Pseudomonas putida* BIRD-1 y de los mutantes *gluQ*, *glcB*, *rpoZ* y *dusB* que están afectados en la asimilación de butanol.

**Figura 2:** **2A.** Crecimiento de la cepa silvestre de *Pseudomonas putida* BIRD-1 y de los mutantes en *glcB*, *rpoZ*, *gluQ*, *aceA* y *dusB* en medio mínimo suplementado con glucosa 0,5%. **2B.** Crecimiento de la cepa silvestre de *Pseudomonas putida* BIRD-1 y de los mutantes en *glcB*, *rpoZ*, *gluQ*, *aceA* y *dusB* en medio mínimo suplementado butanol 0,5%. **2C.** Asimilación de butanol de la cepa silvestre de *Pseudomonas putida* BIRD-1 frente a los mutantes en *glcB*.

**Figura 3:** **3A.** Cinéticas de muerte de la cepa silvestre de *Pseudomonas putida* BIRD-1 y del mutante *glcB* y **3B** de los mutantes en *rpoZ*, *glcB* *dusB*, *gluQ* en presencia de 2% de butanol.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Con el fin de facilitar la comprensión y de aclarar el significado de determinados términos en el contexto de la presente invención se aportan las siguientes definiciones:

**“Célula bacteriana”:** se refiere a cualquier célula procariota gram positiva o gram negativa que pueda ser manipulada genéticamente para proporcionar un mutante con una expresión reducida de al menos alguno de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ*, *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5.

“**Célula genéticamente modificada**”: célula que ha sido manipulada genéticamente para proporcionar una expresión reducida de algún gen ya sea por mutación, silenciamiento o incluso deleción. En particular en el contexto de la invención se refiere a una célula que ha sido manipulada genéticamente para proporcionar una expresión reducida de al menos uno  
5 los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5.

“**Expresión reducida de un gen**”: en el contexto de la invención implica que la célula bacteriana genéticamente modificada tiene un nivel de expresión de un determinado gen  
10 disminuido o incluso nulo frente a la cepa silvestre de la cual procede.

“**Gen *glcB***”: es el gen que codifica la malato sintasa G (ID: 12518619) y tiene una secuencia nucleotídica representada por la SEQ ID NO 1 o por secuencias con un porcentaje de identidad de al menos 90% con la SEQ ID NO 1.  
15

“**Gen *aceA***”: es el gen que codifica la isocitrato liasa (ID: 12518755) y tiene una secuencia nucleotídica representada por la SEQ ID NO 2 o por secuencias con un porcentaje de identidad de al menos 90% con la SEQ ID NO 2.

20 “**Gen *gluQ***”: es el gen que codifica la Glutamil-Q tRNA(Asp) sintetasa (ID: 12522576) y tiene una secuencia nucleotídica representada por la SEQ ID NO 3 o por secuencias con un porcentaje de identidad de al menos 90% con la SEQ ID NO 3.

“**Gen *rpoZ***”: es el gen que codifica la Subunidad  $\omega$  de la RNA polimerasa (ID: 12523257) y  
25 tiene una secuencia nucleotídica representada por la SEQ ID NO 4 o por secuencias con un porcentaje de identidad de al menos 90% con la SEQ ID NO 4.

“**Gen *dusB***”: es el gen que codifica la t-RNA dihidrouridina sintasa B (ID: 1041701) y tiene una secuencia nucleotídica representada por la SEQ ID NO 5 o por secuencias con un  
30 porcentaje de identidad de al menos 90% con la SEQ ID NO 5.

“**Asimilación deficiente de alcoholes**”: hace referencia a la facultad truncada o limitada respecto al uso de alcoholes como fuente de carbono de las bacterias genéticamente modificadas de la invención frente a las cepas silvestres de las que proceden. La asimilación  
35 deficiente de alcoholes proporciona a las células de la invención una capacidad disminuida o nula en la asimilación de alcoholes y de manera especial de butanol.

5 **“Fuente de carbono”**: hace referencia al origen a partir del cual la célula bacteriana genera o sintetiza la materia orgánica de manera heterótrofa. En el contexto de la presente invención al referirse al alcohol como fuente de carbono o más particularmente al butanol como fuente de carbono significa que la célula bacteriana es capaz de generar materia orgánica a partir de alcoholes y/o butanol respectivamente.

10 **“Alcohol o alcoholes”**: en el contexto de la presente invención se refiere a uno o varios compuestos mono o polihidroxilados lineales o ramificados de entre 2 y 32 carbonos, preferiblemente entre 2 y 12 carbonos. De manera particularmente preferida se contemplan el etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol decanol, dodecanol o combinaciones de los mismos .

20 **“Butanol”**: se refiere indistintamente a 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o mezclas de los mismos.

25 **“Célula productora de alcoholes”**: hace referencia a la capacidad de una célula de sintetizar alcoholes ya sea de manera natural o adquirida por modificación genética mediante transformación con uno o más genes implicados en la síntesis de alcoholes.

30 **“Mutagénesis dirigida”**: es un tipo de mutagénesis cuya finalidad es alteración de un gen o secuencia en un lugar determinado, las mutaciones puntuales, inserciones o deleciones se introducen normalmente mediante el uso de primers que contienen la modificación deseada en una reacción de PCR. La finalidad es anular el gen para evitar su normal expresión.

35 **“Mutagénesis aleatoria”**: Son mutaciones puntuales introducidas en posiciones aleatorias del genoma o de un gen determinado. Se puede llevar a cabo a través de PCR utilizando una polimerasa de ADN propensa a errores, con agentes mutagénicos, radiaciones o mediante el uso de transposones en lo que se conoce como mutagénesis insercional.



**“Fuente de carbono alternativas”**: en el contexto de la invención se refieren a fuentes de carbono diferentes de alcoholes como por ejemplo de manera ilustrativa pero no limitativa glucosa, succinato, lactato, benzoato o acetato.

5 **“Composición microbiológica”**: Se refiere a una formulación de elementos donde el elemento esencial es un microorganismo, en el contexto de la presente invención el elemento esencial es una célula bacteriana modificada genéticamente con capacidad disminuida en la asimilación de alcoholes gracias a la expresión reducida de al menos unos de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de  
10 homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5. La composición microbiológica está diseñada para una aplicación concreta, en el caso de la presente invención para la producción de alcoholes y de manera preferente para la producción de butanol.

15 **“Elemento que favorece la producción de alcoholes”**: se refiere a cualquier sustancia, objeto, material biológico que pueda incluirse en la formulación de la composición microbiológica de la invención y que ayude a mejorar la producción de alcoholes y en particular de butanol. El elemento que favorece la producción de alcoholes pueden ser, de  
20 manera particular aunque no limitativa un medio rico en azúcares fermentables, factores de crecimiento, sales minerales, un microorganismo adicional que actúe sinérgicamente en la producción de alcoholes, una enzima que actúe sinérgicamente en la producción de alcoholes o una combinación de los mismos.

**“Azúcar o azúcares fermentables”**: es el producto resultante de procesos de degradación  
25 de biomasa y comprende todos aquellos azúcares que son susceptibles de ser transformados mediante fermentación para dar lugar a alcoholes. Aunque no es el único, el azúcar más abundante es la glucosa, aunque también son azúcares convertibles en alcoholes la xilosa, arabinosa, manosa, y otros azúcares tanto de 5 como de 6 carbonos.

30 **“Microorganismo que actúa sinérgicamente en la producción de alcoholes”**: se refiere a un microorganismo, normalmente una bacteria o levadura, que puede estar presente en la composición microbiológica de la invención y cuya misión es ayudar o facilitar a la célula bacteriana de la invención en la producción de alcoholes. Dicha ayuda puede consistir en que el microorganismo es capaz de metabolizar hacia alcoholes productos o sustancias  
35 presentes en el medio de reacción que la célula bacteriana de la invención es incapaz de transformar (por ejemplo algún tipo de azúcar que la célula bacteriana no es capaz de

metabolizar) o también en que es capaz de metabolizar productos de desecho resultantes del metabolismo de la propia célula bacteriana de la invención. De manera inversa el microorganismo puede actuar sinérgicamente produciendo metabolitos que son transformados por la célula bacteriana de la invención hacia alcoholes.

5

**“Enzima o enzimas que actúa sinérgicamente en la producción de alcoholes”:** Se refiere a una proteína o variedad de proteínas con actividad catalítica para llevar a cabo algún tipo de transformación química en algún producto presente en el medio de reacción de modo que el producto resultante de la acción de la o las enzimas pueda ser transformado posteriormente por la célula bacteriana de la invención.

10

**“Biomasa”:** en el contexto de la presente invención se asimila el término “biomasa” con “biomasa celulósica” esto es toda materia orgánica que comprenda material lignocelulósico y que sea susceptible de ser transformada a sus componentes más elementales (azúcares fermentables) mediante un proceso industrial de degradación con enzimas celulasas. La biomasa puede ser, por ejemplo, la fracción biodegradable de los productos, residuos y restos de origen biológico procedentes de la agricultura (incluyendo sustancias vegetales, tales como residuos de cultivos, y sustancias animales) industrias forestales (tales como recursos madereros) e industrias relacionadas que incluyen pesquerías y acuicultura, así como la fracción celulósica biodegradable de los residuos industriales y urbanos, tales como residuos sólidos urbanos o residuos de papel. También se pueden considerar como biomasa residuos que contengan material fermentable como por ejemplo glicerol, suero de industrias queseras u otros. En el contexto de la invención de manera preferente la biomasa es paja o la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos y de manera aún más preferente, la biomasa es biomasa vegetal seleccionada a partir de la lista que consiste en: biomasa rica en azúcares fermentables, tales como caña de azúcar; biomasa de almidón, por ejemplo, granos o paja de trigo; o maíz o paja de maíz o grano de maíz o fibra de maíz; o granos o paja de cebada; o granos o paja de sorgo. La biomasa también puede ser, arroz, hierba, ramas, etc.

15

20

25

30

**“Degradación de biomasa”:** Es el proceso de transformación de la biomasa celulósica en sus componentes elementales (azúcares fermentables), principalmente glucosa, mediante la acción de celulasas.

35

Célula bacteriana genéticamente modificada con asimilación deficiente de alcoholes

El aspecto principal de la presente invención se refiere a una célula bacteriana genéticamente modificada caracterizada porque presenta una expresión reducida de al menos uno de los siguientes genes:

- a) gen *glcB* de la malato sintasa G,
- b) gen *aceA* de la isocitrato liasa,
- c) gen *gluQ* de la glutamil-Q tRNA(Asp) sintetasa,
- 10 d) gen *rpoZ* de la subunidad  $\omega$  de la RNA polimerasa o
- e) gen *dusB* de la t-RNA dihidrouridina sintasa B, o
- f) de algún gen al menos con un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5,

donde dicha expresión reducida le proporciona a la célula una asimilación deficiente de alcoholes como fuente de carbono.

De manera particular la invención se refiere a una célula bacteriana genéticamente modificada caracterizada porque comprende una mutación en al menos uno de los siguientes genes:

- a) gen *glcB* de la malato sintasa G,
- b) gen *aceA* de la isocitrato liasa,
- c) gen *gluQ* de la glutamil-Q tRNA(Asp) sintetasa,
- d) gen *rpoZ* de la subunidad  $\omega$  de la RNA polimerasa o
- 20 e) gen *dusB* de la t-RNA dihidrouridina sintasa B, o
- f) de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5,

donde dicha mutación le proporciona a la célula una asimilación deficiente de alcoholes como fuente de carbono.

En la tabla 1 se proporciona la información que identifica los genes que deben ser mutados en las células bacterianas con el fin de conseguir que estas pasen a ser deficientes en la asimilación de alcoholes.

35

Tabla 1

GEN	Secuencia nucleotídica	Nº Genebank	Proteína que codifica
<i>glcB</i>	SEQ ID NO 1	12518619	Malato sintasa G,
<i>aceA</i>	SEQ ID NO 2	12518755	Isocitrato liasa
<i>gluQ</i>	SEQ ID NO 3	12522576	Glutamil-Q tRNA(Asp) sintetasa
<i>rpoZ</i>	SEQ ID NO 4	12523257	Subunidad $\omega$ de la RNA polimerasa
<i>dusB</i>	SEQ ID NO 5	1041701	t-RNA dihidrouridina sintasa B

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento por parte de los inventores de que células bacterianas con una expresión reducida por mutación de al menos uno de genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* poseen un fenotipo deficiente en la asimilación de alcoholes, y de manera especial en la asimilación de butanol.

Las células bacterianas con mutaciones en al menos unos de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* han mostrado una capacidad muy reducida de crecer en un medio mínimo con alcohol, preferiblemente butanol, como única fuente de carbono (ver figura 1A y 1B). Las células bacterianas de la invención no tienen alterada, no obstante, su capacidad de asimilación de otras fuentes de carbono como, por ejemplo, la glucosa (ver figura 2A y 2B) y por tanto, son capaces de crecer normalmente en presencia de fuentes de carbono alternativas a los alcoholes y de manera particular en presencia de glucosa.

Esta característica hace de las células bacterianas de la invención especialmente apropiadas para procesos de producción industrial de alcoholes, en particular a partir de azúcares fermentables provenientes de procesos de degradación de biomasa, ya que al no asimilar o asimilar de manera deficiente los alcoholes producidos se pueden conseguir mayores rendimientos en los procesos de producción de alcoholes.

Aunque las células bacterianas de la invención no tienen por qué tener la capacidad natural de producir alcoholes, ya que dicha capacidad se les puede introducir mediante manipulación genética, las células bacterianas son de manera preferida productoras de

alcoholes de manera natural. En una realización particular y preferida de la invención las células de la invención son productoras de butanol.

Las células bacterianas con una expresión reducida de al menos uno de genes *glcB*, *aceA*,  
 5 *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las  
 SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 son deficientes en  
 la asimilación de uno o varios alcoholes de entre 2 y 32 carbonos, preferiblemente de entre  
 2 y 12 carbonos y de manera particular etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol,  
 isobutanol, tert-butanol 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-  
 10 butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-  
 hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-  
 metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-  
 butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-  
 butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-  
 15 metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-  
 hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol decanol, dodecanol o combinaciones de  
 los mismos.

De manera especial las células bacterianas de la invención se muestran deficientes en la  
 20 asimilación de butanol.

Aunque no pretende ser una lista exhaustiva, una realización particular de la invención  
 contempla que las células bacterianas con una expresión reducida de al menos uno de los  
 genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ*, *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o  
 25 identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5,  
 pertenezcan a uno de los siguientes géneros: *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*,  
*Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*,  
*Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*,  
*Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Treponema*,  
 30 *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*,  
*Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Geobacillus*, *Ureobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*,  
*Myxococcus*, *Nocardia*, *Synechocistis*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*  
*Thermoanaerobacterium* o *Zymomonas*.

35

Aun sin ser una lista exhaustiva y de manera más particular, las células bacterianas con una expresión reducida de al menos uno de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ*, *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, pertenecen a uno de las siguientes especies:

5 *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium belfantii*, *Clostridium, saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tyrobutiricum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Escherichia coli*, *Entorococcus faecium* o  
10 *Lactobacillus Brevis*.

La realización preferida de la invención está representada por una célula de *Pseudomonas putida* con una expresión reducida por mutación en al menos uno de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB*. De manera más preferida la célula pertenece a la cepa *Pseudomonas putida* BIRD-1.  
15

Como ya se ha especificado más arriba son preferidas en el contexto de la presente invención células bacterianas que de manera natural produzcan alcoholes y que posean toda la maquinaria enzimática necesaria para producir por sí mismas los alcoholes  
20 deseados. Esto ocurre, por ejemplo, en el caso de *Pseudomonas putida*, y más particularmente con *Pseudomonas putida* BIRD-1 que de manera natural es productora de butanol. No obstante, también se contempla en la presente invención células bacterianas que aun no siendo productoras naturales de alcoholes han sido modificadas genéticamente para expresar uno o más genes que favorezcan determinadas rutas metabólicas para  
25 mejorar la producción de algún o algunos tipos de alcoholes. Incluso se contempla en la presente invención la modificación genética para incorporar genes exógenos de rutas metabólicas completas.

Por ejemplo, y de manera particular, la presente invención contempla la transformación de  
30 una célula bacteriana con una expresión reducida de al menos uno de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ*, *dusB*, o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, con uno o más de los genes de la vía sintética para la producción de 1-butanol. Dicha ruta sintética aparece descrita en la solitud US2008/0274524 cuyo contenido se considera aquí incorporado. La vía  
35 sintética para producir 1-butanol comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:

- a) acetil-CoA a acetoacetil-CoA, catalizada por ejemplo por la acetil-CoA acetiltransferasa
- b) acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA, catalizada por ejemplo por la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa
- c) 3-hidroxiacetil-CoA a crotonil-CoA, catalizada por ejemplo por crotonasas
- 5 d) crotonil-CoA a butiril-CoA, catalizada por butiril-CoA
- e) butiril-CoA a butiraldehído, catalizada por ejemplo por butiraldehído deshidrogenasas y
- f) butiraldehído a 1-butanol, catalizada por ejemplo por 1-butanol deshidrogenasas.

De manera particular, la presente invención también contempla la transformación de una  
10 célula bacteriana con una expresión reducida de al menos uno de los genes *glcB*, *aceA*,  
*gluQ*, *rpoZ*, *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las  
SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, con uno o más de  
los genes de la vía sintética para la producción de 2-butanol. Dicha ruta sintética aparece  
descrita en las solicitudes US2007/025941 y US2007/0292927 cuyo contenido se considera  
15 aquí incorporado. La vía sintética para producir 2-butanol comprende las siguientes  
conversiones de sustrato a producto:

- a) piruvato a alfa-acetolactato catalizada por ejemplo por la sintasa de acetolactato
- b) alfa-acetolactato a acetoína, catalizada por ejemplo por ejemplo por la acetolactato  
20 descarboxilasa c) acetoína a 2,3-butanodiol, catalizada por ejemplo por la butanodiol  
deshidrogenasa
- d) 2,3-butanodiol a 2-butanona, catalizada por ejemplo por butanodiol deshidratasa y
- e) 2-butanona a 2-butanol, catalizada por ejemplo por la 2-butanol deshidrogenasa.

De nuevo de manera particular, la presente invención también contempla la transformación  
de una célula bacteriana con una expresión reducida de al menos uno de los genes *glcB*,  
*aceA*, *gluQ*, *rpoZ*, *dusB*, o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con  
las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, con uno o más  
de los genes de la vía sintética para la producción de isobutanol. Dicha ruta sintética  
30 aparece descrita en la solicitud US2007/0092957 cuyo contenido se considera aquí  
incorporado. La vía sintética para producir isobutanol comprende las siguientes  
conversiones de sustrato a producto:

- a) piruvato a acetolactato, catalizada por ejemplo por la acetolactato sintasa
- b) acetolactato a 2,3-dihydroxiisovalerato, catalizada por ejemplo por la ácido acetohidroxi  
35 isomeroreductasa

- c) 2,3-dihidroxiisovalerato a  $\alpha$ -cetoisovalerato, catalizada por ejemplo por la ácido acetohidroxi deshidratasa
- d)  $\alpha$ -cetoisovalerato a isobutiraldehído, catalizada por ejemplo por una cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada y
- 5 e) isobutiraldehído a isobutanol, catalizada por ejemplo por una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada.

Método para producir una célula bacteriana con asimilación deficiente de alcoholes

Otro aspecto relevante de la invención lo representa un método para producir una célula o  
10 células bacterianas con asimilación deficiente de alcoholes que comprende:

- a) Seleccionar una célula bacteriana con capacidad de asimilar alcoholes como fuente de carbono,
- b) inducir una mutagénesis dirigida o aleatoria en al menos uno de genes *glcB*, *aceA*,  
15 *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* o en algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, en dichas células y
- c) opcionalmente, aislar los clones mutantes

20 El primer paso del método (etapa a) implica la selección de una célula bacteriana con capacidad de asimilar alcoholes que será la célula que deberá ser sometida a mutagénesis para truncar o limitar dicha capacidad de asimilación de alcoholes. La presente invención está dirigida a producir bacterias que optimicen la producción de alcoholes a través de una estrategia de disminución y/o eliminación total en la asimilación de alcoholes como fuente de  
25 carbono, por lo que obviamente la célula bacteriana silvestre de la que se parte debe asimilar de manera natural alcoholes, de otro modo no sería una célula apta para llevar a cabo el método de la presente invención.

Sin pretender ser una lista exhaustiva la célula bacteriana con capacidad de asimilar alcoholes como fuente de carbono se puede seleccionar entre células de los géneros:  
30 *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Treponema*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Geobacillus*; *Ureobacillus*,



*Listeria, Mycobacterium, Myxococcus, Nocardia, Synechocistis, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces Thermoanaerobacterium o Zymomonas.*

5 Aun sin pretender ser una lista exhaustiva, y de manera más particular, la célula con capacidad de asimilar alcoholes se selecciona de entre células de las especies *Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas stutzeri Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Clostridium thermosaccharolyticum, Clostridium belfantii, Clostridium, saccharoperbutylacetonicum, Clostridium pasteurianium, Clostridium tyrobutyricum, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens Zymomonas mobilis,*  
 10 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, Escherichia coli, Entorococcus faecium o Lactobacillus Brevis.*

La etapa b) del método de producción comprende inducir la mutagénesis de uno o más de los genes *glcB, aceA, gluQ, rpoZ o dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5,  
 15 en dichas células. La idea de producir la mutagénesis tiene la finalidad de que al menos uno de los genes *glcB, aceA, gluQ, rpoZ, dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 vea disminuida o reducida por completo su expresión.

La mutagénesis se puede llevar a cabo de manera dirigida o mediante mutación aleatoria  
 20 seguida de identificación de los mutantes para estos genes.

En cuanto a la mutagénesis dirigida cualquier método conocido para un experto en la materia puede usarse para producir una mutación en al menos uno de los genes *glcB, aceA, gluQ, rpoZ, dusB* o en algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5. Los métodos de  
 25 modificación genética dirigida incluyen, pero no se limitan a la delección de todo el gen o una porción de los genes *glcB, aceA, gluQ, rpoZ, dusB* o a la delección de todo o alguna porción de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5; a la inserción de un fragmento de ADN en los genes *glcB, aceA, gluQ, rpoZ, dusB* o en gen con al menos un 90% de homología o  
 30 identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, (ya sea en el promotor o en región codificante) de forma que la proteína codificada por ellos no se exprese o se exprese a niveles más bajos; a introducir una mutación en la región codificante de los genes *glcB, aceA, gluQ, rpoZ, dusB* o en algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4,

SEQ ID NO 5 que añada un codón de parada o cambio de lectura de tal manera que no se exprese una proteína funcional; o la introducción en la región codificante de *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ*, *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, de una o más mutaciones para alterar la secuencia aminoácidica de manera que se exprese una proteína menos funcional o afuncional.

Además, la expresión de al menos unos de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, puede bloquearse mediante la expresión de un ARN antisentido o un ARN de interferencia, y pudiéndose introducir las construcciones génicas que resulten en cosupresión. Además la síntesis o estabilidad del transcripto puede ser disminuida por mutación. Del mismo modo la eficiencia con la cual una proteína se traduce a partir de ARNm puede ser modulada por la mutación.

Todos estos métodos pueden ser llevados a cabo fácilmente por un experto en la materia conociendo las secuencias de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* (SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 5).

Para algunos procedimientos de mutagénesis dirigida también pueden ser útiles conocer de las secuencias que rodean los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB*. En particular, conocer las secuencias de ADN que rodean la secuencia de codificación de *GlcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* son de utilidad en métodos de modificación basados en la recombinación homóloga. Este método implica colocar secuencias flanqueantes del cualquiera de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* unidas a un gen marcador seleccionable para mediar la recombinación homóloga reemplazándose el gen diana (*glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* según el caso) por el gen marcador. También se pueden usar secuencias parciales de los genes diana (*glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB*) y secuencias flanqueantes unidas a un gen marcador para mediar la recombinación homóloga de tal modo que el gen marcador sustituye parcialmente el gen diana. Además, los marcadores de selección pueden estar unidos a lugares de recombinación sitio-específicos de modo que tras la expresión de la correspondiente recombinasa sitio específica, el gen de resistencia es escindido del gen diana sin que este se reactive posteriormente. La recombinación sitio-específica deja un sitio de recombinación que produce una disrupción en la expresión de los genes diana (*glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB*). El vector de recombinación homóloga puede ser también diseñado para dejar una delección en el gen diana después de la excisión del marcador de selección. Asimismo, se pueden usar métodos de reemplazo de promotores con el fin de

intercambiar los elementos de control endógeno permitiendo otros medios de modulación de la expresión tal y como se describe en Yuan et al. [Metab. Eng. (2006) 8: 79-90].

En cuanto a las técnicas de mutagénesis aleatoria comúnmente utilizadas [revisadas en Miller, JH (1992) Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Press; Plainview NY), estas incluyen mutagénesis espontánea, mutagénesis causada por genes mutadores, mutagénesis química, la irradiación con UV o rayos X, y la inserción de transposones.

La mutagénesis química se puede llevar a cabo como se describe en Miller [Unit 4 of Miller JH (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 81-211).

10 En una realización particular y preferida de la invención la mutagénesis es llevada a cabo por inserción de transposones. Los transposones son introducidos en bacterias de varias maneras, incluyendo:

a) Transducción mediada por fago. Este método ha sido utilizado tanto en contextos especie-específicos como en contexto de especies cruzadas.

15 b) Conjugación. De nuevo, esta puede ser entre miembros de la misma o diferentes especies.

c) Transformación. Para ella se puede usar la captación de DNA mediada por shock eléctrico y ayudado químicamente

El transposón expresa una transposasa en la célula receptora que cataliza el salto del gen a partir del ADN entrante al genoma de la bacteria huésped o receptora. El ADN del transposón puede estar libre, incorporado en ácido nucleico de un fago o plásmido o formando un complejo con la transposasa. Habitualmente se evita la replicación y/o el mantenimiento del ADN entrante que contiene el transposón, de modo que se asegure que la selección genética mediante un marcador en el transposón (normalmente de resistencia a antibióticos) es el resultado del movimiento del transposón del DNA exógeno al genoma del receptor. Un método alternativo es aquel en el que la transposición se lleva a cabo con ADN cromosómico, fragmentos del mismo, o un fragmento del mismo in vitro, y entonces el nuevo alelo de inserción que se crea se introduce en una célula receptora donde reemplaza el alelo residente por recombinación homóloga. La inserción de transposones se puede llevar a cabo como se describe en Kleckner y Botstein [J. Mol. Biol, 1977, 116: 125-159] o en V de Lorenzo, M Herrero, U Jakubzik, y K N Timmis [J Bacteriol. Nov 1990; 172(11): 6568–6572]

o como se indicaba anteriormente a través de cualquier método derivado. Una manera de mutagénesis mediante inserción de transposones se describe más adelante en los ejemplos.

Una vez producidos los mutantes para al menos uno de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ*, *dusB* o para algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y especialmente en el caso de la mutagénesis aleatoria, se puede proceder a su selección y aislamiento y conservación.

Los clones mutantes para los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* o para algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 con asimilación deficiente de alcoholes pueden seleccionarse y aislarse, por ejemplo, mediante crecimiento diferencial en medios con alcoholes como única fuente de carbono frente a otras fuentes de carbono alternativas. A modo de ejemplo, un clon mutante, seleccionado en una fuente de carbono no selectiva como por ejemplo glucosa, puede ser sembrado por duplicado en un medio con algún alcohol como única fuente de carbono, por ejemplo butanol, y al mismo tiempo en un medio con otra fuente de carbono alternativa, por ejemplo glucosa. Al mismo tiempo se sembraría como microorganismo control la bacteria silvestre siguiendo el mismo patrón: por duplicado en un medio con butanol como única fuente de carbono y en un medio con glucosa como única fuente de carbono. Un determinado clon mutante que tenga un crecimiento menor en el medio con butanol frente al control pero que mantenga un crecimiento normal en glucosa implica que dicho clon mutado posee una asimilación deficiente del alcohol (butanol).

Tras su selección y aislamiento dicho clon puede ser caracterizado y mantenido por los métodos comunes para cualquier experto en la materia.

En la presente invención, la caracterización de los mutantes con asimilación deficiente de alcoholes ha dado como resultado que estos poseían mutaciones en al menos uno de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB*.

#### Composición microbiológica para la producción de alcoholes

Otro aspecto de la invención es una composición microbiológica para producir alcoholes que comprende células bacterianas con asimilación deficiente de alcoholes como fuente de carbono y, opcionalmente, al menos un elemento adicional que favorezca la producción de alcoholes.

La composición de la invención comprende como elemento esencial de la misma, células con asimilación deficiente de alcoholes tal y como han sido descritas en la presente invención. Como se trata de una composición dirigida a la producción de alcoholes las células deben tener la capacidad de producir alcohol ya sea de manera natural o de manera  
5 adquirida por medio de manipulación genética como se explicaba más arriba.

La composición de la invención normalmente se presenta en forma líquida aunque puede presentarse en forma sólida reconstituible.

10 De manera opcional aunque preferida, la composición comprende al menos un elemento adicional que favorece la producción de alcoholes. Dicho elemento que favorece o facilita la producción de alcoholes puede ser cualquier agente químico, físico o biológico que ayude a mejorar el rendimiento en la producción de alcoholes.

15 En una realización particular, el elemento opcional que favorece la producción de alcoholes es un medio de cultivo adecuado que permita sacar el mayor rendimiento a la producción de alcoholes. El medio de cultivo puede ser modificado en función del tipo de célula bacteriana utilizada y también en función del tipo de alcohol que quiera producirse. Un experto en la materia conoce bien qué tipo de modificaciones deben llevarse a cabo en un  
20 medio de cultivo para sacar el máximo rendimiento a la producción de alcoholes.

Uno de los elementos fundamentales que debe poseer el medio de cultivo es que incorpore el sustrato apropiado para que se dé la fermentación deseada. En procesos de producción industrial de alcoholes el sustrato habitual para las reacciones de fermentación son los  
25 azúcares fermentables. Aunque los tipos de azúcares fermentables apropiados para la fermentación dependerán del tipo de bacteria o microorganismo utilizado y el tipo de fermentación alcohólica que se desee potenciar, el más habitual es la glucosa, aunque no excluye xilosa, arabinosa, manosa y otros azúcares de 5 y 6 carbonos. Los azúcares fermentables pueden provenir de cualquier fuente y pueden ser incorporados a la  
30 composición de la invención, sin embargo de manera preferente los azúcares provienen de procesos de degradación de biomasa.

Otros elementos que se pueden adicionar a la composición para suplementar el medio de cultivo son fuentes de nitrógeno o azufre que son elementos esenciales para las bacterias.  
35 Estos elementos pueden ser cubiertos de modo muy distinto, dependiendo del tipo de bacteria que consideremos aunque pueden presentarse en forma de  $\text{NO}_3^-$ , amonio ( $\text{NH}_4^+$ ),

aminoácidos o péptidos para el caso del nitrógeno y como  $\text{SO}_4^{2-}$ , sulfuros ( $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{SH}^-$ ) o azufre orgánico (cisteína).

5 Asimismo, los medios de cultivo pueden suplementarse con alguna fuente de fósforo que es un elemento esencial para la síntesis de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, y también aparece también en coenzimas y en proteínas. Suelen usarse en forma de fosfatos orgánicos o inorgánicos.

10 Otros elementos que pueden ser necesarios en los medios de cultivos son las sales minerales. Estas son la fuente de aniones (p. ej. el  $\text{Cl}^-$ ) y cationes para las células. Los cationes  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ , concretamente, se necesitan en cantidades relativamente grandes. Otras sales que se necesitan en cantidades minúsculas y, a los que habitualmente se conocen como micronutrientes u oligoelementos, son el manganeso, el cobalto, el zinc, el molibdeno o el níquel.

15 Por último, pueden ser necesarios incorporar en un medio de cultivo apropiado factores de crecimiento que son moléculas orgánicas que algunas bacterias necesitan en muy pequeña cantidad para crecer. Suelen ser coenzimas o sus precursores, vitaminas, que determinadas bacterias no pueden fabricar por sí mismas, al carecer de parte o toda una ruta biosintética.

20 Algunas de estos factores de crecimiento son el ácido p-aminobenzoico (PABA), el ácido fólico, la biotina, la cobalamina (vitamina B12), la niacina (ácido nicotínico, la riboflavina, el ácido pantoténico, la tiamina (vitamina B1), complejo B6 (pirodoxal, piridoxamina) o grupo K, quinonas.

25 La composición de la invención puede por tanto opcionalmente comprender como elemento que favorezca la producción de alcoholes un medio de cultivo adecuado para favorecer el crecimiento y producción del alcohol deseado. Un experto en la materia es capaz de discernir como combinar los elementos necesarios anteriormente mencionados para obtener el máximo rendimiento en la producción. Sin embargo, en una realización preferida la composición comprende opcionalmente un medio de cultivo rico en azúcares fermentables,

30 de modo que se obtengan altos rendimientos en la producción de alcoholes por fermentación.

En otra realización particular el elemento adicional que favorece la producción puede ser otro microorganismo que actúa sinérgicamente en la producción de alcoholes. Dicho microorganismo puede ser otra bacteria o algún otro microorganismo como una levadura,

35 por ejemplo. La idea del uso de estos microorganismos en la composición microbiológica de

la invención es que puedan metabolizar hacia alcoholes productos o sustancias presentes en el medio de reacción que la célula bacteriana de la invención es incapaz de transformar (por ejemplo algún tipo de azúcar que la célula bacteriana no sea capaz de metabolizar) o también en que sea capaces de metabolizar productos de desecho resultantes del metabolismo de la propia célula bacteriana de la invención para potenciar el rendimiento de la producción de alcoholes. De manera inversa, el microorganismo puede actuar sinérgicamente produciendo metabolitos que son transformados por la célula bacteriana de la invención hacia alcoholes. De manera particular aunque no limitativa algunos microorganismos que pueden ser usados como microorganismos sinérgicos en la producción de alcoholes *Zymomonas*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia*, *Deinoccus*, *E. coli*, *Klebsiella* y otros.

En otra realización particular, el elemento adicional que favorece la producción puede ser alguna enzima o variedad de enzimas que actúen sinérgicamente en la producción de alcoholes. La enzima o enzimas pueden actuar transformando elementos del medio en sustratos que puedan ser fermentados por la célula bacteriana productora de alcoholes de la invención o por el microorganismo adicional y opcional de la composición. Por otro lado, las enzimas que actúen sinérgicamente en la producción de alcoholes pueden ayudar a producir alcoholes a partir de sustratos a partir de los cuales las células bacterianas de alcoholes no son capaces de producirlas por ejemplo la combinación de la  $\alpha$ -cetoacido decarboxilasa ( $\alpha$ -KDC) y la alcohol deshidrogenasa (ADH).

Como es lógico una realización particular de la invención contempla que el elemento opcional que favorece la producción de alcoholes sea una combinación de todos los elementos anteriormente descritos.

25

#### Uso de una célula bacteriana con asimilación deficiente de butanol

Otro aspecto general de la invención se refiere al uso de una célula bacteriana de la invención o de una composición de la invención para la producción de alcoholes.

Obviamente, para un uso en la producción de alcoholes la célula bacteriana de la invención debe tener capacidad para producir alcoholes ya sea de manera natural o adquirida tal como se explica más arriba.

El uso aquí descrito tiene su fundamento en el hecho de que, las células de la invención, al tener una asimilación deficiente de alcoholes, no son capaces de utilizarlos como fuente de carbono o los utilizan de manera limitada a medida que estos se producen.

5 En este sentido, los alcoholes para los cuales se ve favorecido el rendimiento de producción por la asimilación defectuosa por parte de las células bacterianas de la invención son alcoholes de entre 2 y 32 carbonos, preferiblemente de entre 2 y 12 carbonos y de manera particular etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-  
10 metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-  
15 etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol decanol, dodecanol o combinaciones de los mismos.

Una realización particular y preferida de la invención contempla el uso de una célula bacteriana de acuerdo de la invención o de una composición de la invención para la  
20 producción de butanol.

Dentro del aspecto general relativo al uso de la invención, un aspecto particular hace referencia a un procedimiento para producir alcoholes que comprende:

25 a) incubar la célula de acuerdo con la invención y con capacidad de producir alcoholes o la composición de la invención, en presencia de azúcares fermentables, para producir alcoholes por fermentación,  
b) recuperar los alcoholes producidos en la etapa a).

30 Las condiciones para llevar a cabo la fermentación dependerán principalmente del tipo de bacteria o microorganismo utilizado. Normalmente, las condiciones se adaptarán a las condiciones óptimas en las que el microorganismo en cuestión lleve a cabo el proceso de fermentación. Aunque no hay unas condiciones fijas, típicamente el tiempo de fermentación varía entre 6, 24 y 96 horas, la temperatura entre 26°C y 60°C, preferentemente entre 32°C



y 50°C y el pH entre 3 y 9, preferentemente entre 4 y 5, entre 4 y 6 o entre 4 y 7, entre 5 y 8 y entre 6 y 9.

5 La cantidad de inóculo de la bacteria o microorganismo fermentante también dependerá igualmente del tipo de bacteria o microorganismo aunque típicamente el microorganismo fermentante se puede aplicar en cantidades de entre  $10^5$  y  $10^{12}$  células/ml de caldo de cultivo.

10 En función de la bacteria o microorganismo usado se obtendrán diferentes alcoholes ya que cada bacteria tiene un metabolismo característico y propio. En este sentido un experto en la materia seleccionará el microorganismo más conveniente en función del alcohol o alcoholes que desee obtener. Sin pretender ser una lista limitativa algunos de los alcoholes que se pueden obtener mediante el procedimiento aquí descrito incluyen: alcoholes de entre 2 y 32 carbonos, preferiblemente de entre 2 y 12 carbonos y de manera particular etanol, propanol, 15 isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol decanol, dodecanol o combinaciones de los mismos.

25 En una realización particular y preferida el procedimiento de la invención comprende el uso de una célula bacteriana de *Pseudomonas putida* o una composición que comprende *Pseudomonas putida*.

En otra realización particular y preferida el procedimiento es un procedimiento de producción de butanol.

30 En otra realización particular y preferida el procedimiento de la invención comprende el uso de glucosa como azúcar fermentable.

35 La etapa b) del procedimiento de producción de alcoholes comprende la recuperación de los mismos. El o los alcoholes producidos pueden recuperarse del medio de fermentación

mediante cualquier método conocido incluyendo pero sin limitarse a cromatografía, procesos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, los alcoholes pueden separarse del caldo de fermentación por métodos convencionales de destilación.

## 5 EJEMPLOS

En la realización de los siguientes ejemplos se utilizaron las siguientes materiales y métodos generales.

10 La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo empleando el sistema High Pure Plasmid Purification Kit (Roche), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo empleando el GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (GE Healthcare) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

15 La amplificación del DNA se realizó en un equipo Mastercycler Gradient de Eppendorf. Las mezclas de reacción contenían  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, dimetilsulfóxido al 10%, 0,5 unidades de DNA polimerasa, 100 ng de DNA molde y oligonucleótidos a una concentración final de 0,5  $\mu M$ .

20 La purificación de los fragmentos de DNA se hizo empleando geles de agarosa, usando el kit GeneClean (BIO 101) o el kit "High Pure™ PCR Product Purification Kit" (Boehringer Mannheim).

Las técnicas utilizadas para la preparación y manipulación del DNA han sido descritas por Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

25 Para la elaboración de la colección de mutantes se siguieron los procedimientos descritos en *Pseudomonas Methods and Protocols*. Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 1149. Filloux, Alain, Ramos, Juan-Luis (Eds.), 2014.

30 Los medios empleados para seleccionar de la librería, los mutantes afectados en asimilación de butanol fueron: el medio mínimo sólido M9 glucosa 0,5 % como control de crecimiento y medio mínimo M9 con butanol 0,5 % como única fuente de carbono Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Las enzimas de restricción se obtuvieron de Amersham, Takara y New England Biolabs

La enzima T4 DNA ligasa fue proporcionada por USB (Amersham).

5 La DNA polimerasa I de *Thermus* sp. y la Pfu polimerasa fueron suministradas por Biotools B&M Labs. S. A. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales.

La técnica usada para la secuenciación para identificar el lugar de interrupción de los genes fue el método clásico Sanger.

10 **Ejemplo 1: Generación de una colección de mutantes de *Pseudomonas putida* mediante mutagénesis aleatoria con transposones**

Para la detección de mutantes deficientes en asimilación de butanol como fuente de carbono se generó una colección ordenada de mutantes mediante inserciones aleatorias del transposón Mini-Tn5 [De Lorenzo et al, 1990, J. Bacteriol. 172(11):6568-6572].

15 La mutagénesis con el transposón MiniTn5-Km se realizó mediante el apareamiento triparental entre el receptor (*P. putida* BIRD-1), el donante (*Escherichia coli* CC118 (*λpir*) con pUT- Km) y ayudante (*E. coli* HB101 con pRK600) (de Lorenzo, V. and K.N. Timmis, *Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons*. Methods Enzymol, 1994. **235**: p. 386-405). Después del cultivo durante 12h, volúmenes iguales de los tres cultivos se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en LB, se mezclaron y se centrifugaron. Muestras con un volumen final de 500µl de la mezcla de las tres cepas se colocaron en la superficie de filtros de 0,45 µm sobre placas de LB. Después de 6 h de incubación a 30 °C, las células se resuspendieron en medio mínimo 1XM9.

20

25

**Ejemplo 2: Selección e identificación de transconjugantes**

30 Con el fin de seleccionar los clones transconjugantes, la dilución óptima se sembró en medio mínimo M9 con kanamicina (Km) y rifampicina (Rif) suplementado con benzoato de sodio 10 mM como fuente de carbono.

Los transconjugantes seleccionados (7,860) fueron ordenados en placas de 384 pocillos usando un robot QPix2 (Genetix).

5 Para la evaluación y la identificación de clones, la colección de mutantes se recogió mediante el uso del robot QPix2 (Genetix) en placas que contienen los siguientes medios: medio mínimo M9 con glucosa 0,5% (v/v) y medio mínimo M9 con 0,5% (v/v) de butanol como única fuente de carbono en presencia de Km para probar si el mini transposón estaba presente en todos los mutantes.

10 Para comprobar que los mutantes estaban afectados en asimilación, las células fueron cultivadas en medio mínimo con glucosa, y medio mínimo con butanol 0,5% (v/v) como única fuente de carbono.

### **Ejemplo 3: Identificación de los mutantes**

15

Después de la selección de los mutantes deficientes en asimilación de butanol en presencia de butanol en medios selectivos, se realizó una PCR arbitraria usando Taq polimerasa (Euroclone) para identificar el punto de inserción según descrito en Caetano-Anolles, G. [*Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers*. PCR Methods Appl, 1993. **3**(2): p. 85-94] y O'Toole, G.A. et al. [*Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis*. Mol Microbiol, 1998. **28**(3): p. 449-61.

20

Con el cebador TNINT (5'- AGGCGatttcagcgaagcac - 3' (SEQ ID NO6) (Sigma) [Duque, J.-L., et al., *Towards a Genome-Wide Mutant Library of Pseudomonas putida Strain KT2440*, in *Pseudomonas*. 2007, Springer Netherlands. p. 227-251.], se realizó la secuenciación de Sanger en un secuenciador 3130xl (Applied Biosystems). Las secuencias fueron analizadas utilizando el algoritmo BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

25

30 Después de la PCR arbitraria y secuenciación de Sanger, se encontraron un gran número de mutantes afectados en el metabolismo relacionado con la conversión de la energía y los nucleótidos, así como en procesos de transporte.

Se identificaron mutantes defectuosos en la asimilación de butanol, entre ellos cinco mutantes con tres puntos diferentes de inserción en malato sintasa G (*glcB*), una enzima clave de la vía de glioxilato (metabolismo de la energía y la conversión). Asimismo, un único

35

mutante de glutamil-Q tRNA (Asp) sintetasa (*gluQ*) (traducción) era defectuoso en la asimilación de butanol. Otros mutantes deficientes en asimilación de butanol tenían una inserción en el gen de la subunidad  $\omega$  de la RNA polimerasa (*rpoZ*), en el gen de la isocitrato liasa (*aceA*) y t-RNA dihidrouridina sintasa B (*dusB*) respectivamente.

5

#### **Ejemplo 4: Caracterización de los mutantes en presencia de glucosa y butanol como únicas fuentes de carbono**

Los 5 mutantes del gen de la malato sintasa G (*glcB*) tenían interrumpido el gen en tres puntos de inserción diferentes. Todos los fenotipos se comprobaron mediante repique en medio mínimo butanol 0,5% observándose un fenotipo deficiente en asimilación de butanol.

Respecto al mutante en *glcB* se realizaron pruebas de crecimiento por triplicado en presencia de glucosa 0,5 % (v/v) y en presencia de butanol como única fuente de carbono usando un Bioscreen (Oy Growth Curves Ab Ltd). Los valores de turbidez (DO) se determinaron mediante la medida de la turbidez espectrofotométricamente a una longitud de onda de 660 nm. La cepa que tiene interrumpido *glcB* tras 68 horas de incubación no superaba una densidad óptica de 0,160 mientras que el fenotipo del silvestre supera una densidad óptica de 0,650 (Figura 1A). Estos resultados evidencian claramente que los mutantes *glcB* son deficientes en la asimilación de alcoholes.

Del mismo modo se realizaron estas pruebas para el resto de los mutantes seleccionados (Figura 1B).

Para la ejecución de las curvas de crecimiento de todos los mutantes en matraz, las células se cultivaron a 30°C y 200 rpm de agitación en medio mínimo M9 (MM9) (Abril et al; 1989) suplementado con butanol 0,5% como fuente de carbono. Para los controles positivos de crecimiento de cada cepa (butanol 0 %) se sustituyó el butanol por glucosa como fuente de carbono. El seguimiento del crecimiento se realizó por medida de la turbidez (DO<sub>660</sub>) a diferentes tiempos. Todos los cultivos se inocularon a una DO<sub>660</sub> de partida de 0,1. Las figuras 2A y 2B muestran cómo mientras los mutantes crecen de manera similar a la cepa silvestre en un medio mínimo con glucosa, no crecen igual únicamente en presencia de butanol como fuente de carbono. Los mutantes deficientes en asimilación de butanol tienen un crecimiento inferior frente a la cepa salvaje cuando se usa butanol como única fuente de carbono. Esto demuestra que los mutantes seleccionados tienen un fenotipo deficiente en la asimilación de butanol.

En otro análisis se midió el consumo de butanol mediante HPLC usando una columna Aminex HPX 87H de Biorad, y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvil, (figura 2C). Los resultados muestran que el mutante en el gen *glcB* asimila un 60% menos de butanol que la correspondiente cepa silvestre.

5 **Ejemplo 5: Ensayos de supervivencia y cinética de muerte**

También se ensayó la supervivencia de los mutantes en ensayos de cinéticas de muerte.

Para medir la supervivencia, las células se cultivaron durante la noche en medio LB, posteriormente se diluyeron hasta alcanzar una densidad óptica de 0,05 y se monitoreo el crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8 (OD<sub>660nm</sub>). A continuación, los cultivos  
 10 fueron separados en dos fracciones, a la primera se le añadió 2% de butanol (v/v) y la otra se utilizó como control. Se determinó el número de células viables después de la aplicación del choque de butanol mediante el plaqueado de las diluciones apropiadas. Los experimentos se realizaron tres veces.

Las células mutadas en fase exponencial de crecimiento sometidas a un choque del 2 %  
 15 (v/v) de butanol mostraron una supervivencia mayor que la presentada en la cepa silvestre (Figura 3A y 3B).

**Ejemplo 6: Análisis proteómico**

Para estudiar el proteoma, las células cultivadas en las distintas condiciones se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 2 minutos y se lavaron con medio M9 sin ninguna  
 20 fuente de carbono, a continuación, las células se almacenaron a -80°C .El precipitado de células se resuspendió en 5 volúmenes de tampón P (fosfato de sodio a pH 8.2 suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). Las células se lisaron a 4 °C mediante sonicación usando un equipo UP50H Ultrasonic Processor (Hielscher Ultrasonics GmbH; max. output 45W) sonicator.

25 El contenido de proteína de las fracciones solubles resultantes se cuantificó mediante el kit de ensayo de proteínas basado en el método de Bradford (BioRad). Se añadió tampón de muestra de gel de proteína (LDS (Invitrogen, Dodecil sulfato de litio -β- mercaptoetanol) en una proporción de 10 µl por 50 g de proteínas. Para la fracción específica de proteínas de  
 30 membrana, el pellet obtenido tras la sonicación se resuspendió en 1 ml de tampón P. Las muestras se centrifugaron durante 30 min a 13.000 xg y el material sedimentado se lavó dos veces con tampón P para eliminar proteínas contaminantes citosólicas. Los precipitados finales se resuspendieron en 20 µl de tampón de muestra de gel de proteína LDS. Las

muestras de proteínas solubles y las fracciones específicas de proteína de membrana se incubaron luego a 99 °C durante 5 min antes de la cromatografía en SDS-PAGE.

5 Se cargaron 50 µg de proteína soluble y de membrana extraídas de 100 mg (peso húmedo) de material celular en una electroforesis NuPAGE® SDS-PAGE Gel System | (Invitrogen). Los geles se desarrollaron con tampón MES a 200 V y se tiñeron con el colorante Coomassie Blue Safe. El análisis del patrón de proteínas en ambas condiciones mostraba el aumento en la cantidad de una proteína cuando las células crecían usando butanol como única fuente de carbono. Después de desteñir durante 12 h el contenido total de proteína de cada pocillo 10 fue recortado del gel de acrilamida, estas bandas se destiñeron completamente y se sometieron a una reacción de alquilación usando iodoacetamida, tal y como se ha descrito previamente (Hartmann EM, Armengaud J. 2014. Environmental Microbiology 16: 162-76). Posteriormente se llevó a cabo una reacción de proteólisis con el kit Gold-trypsin y ProteaseMax surfactant (Promega), la digestión se para después de 1h a 50°C añadiendo 15 0,5% de trifluoroacético a las muestras.

El análisis de espectrometría en Tandem se realizó en un equipo LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) y los resultados se analizaron con el software Mascot Daemon (versión 2.3.2; Matrix Science).

20 En los resultados del estudio del proteoma global de *Pseudomonas putida* BIRD-1, la comparación de las situaciones en fase exponencial de cultivos de células en presencia de glucosa como fuente de carbono frente a butanol como única fuente de carbono dio como resultado un cambio en la cantidad de la proteína GlcB de 4,7 veces frente a su presencia 25 en la situación control, lo que demuestra que GlcB es una proteína relevante en el metabolismo del butanol, involucrada en la asimilación del mismo.

## REIVINDICACIONES

1. Una célula bacteriana genéticamente modificada caracterizada porque presenta una expresión reducida de al menos uno de los siguientes genes:
- 5 a) gen *glcB* de la malato sintasa G,  
b) gen *aceA* de la isocitrato liasa,  
c) gen *gluQ* de la glutamil-Q tRNA(Asp) sintetasa,  
d) gen *rpoZ* de la subunidad  $\omega$  de la RNA polimerasa o  
e) gen *dusB* de la t-RNA dihidrouridina sintasa B, o
- 10 f) de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5,  
donde dicha expresión reducida le proporciona a la célula una asimilación deficiente de alcoholes como fuente de carbono.
- 15 2. Una célula de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicha expresión reducida de al menos uno de los genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ* o *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, comprende la mutación de alguno de dichos genes
- 20 3. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el alcohol para el cual posee una asimilación deficiente se selecciona entre uno o varios alcoholes de entre 1 y 32 carbonos, preferiblemente de entre 1 y 12 carbonos.
4. Una célula de acuerdo con la reivindicación 3 donde el alcohol para el cual posee una asimilación deficiente es el etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol decanol, dodecanol o combinaciones de los mismos .

35



5. Una célula de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones anteriores que pertenece a uno de los siguientes géneros *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*,  
 5 *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Treponema*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Geobacillus*, *Ureobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Nocardia*, *Synechocistis*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces* *Thermoanaerobacterium* o *Zymomonas*.
- 10 6. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que pertenece a una de las siguientes especies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium belfantii*, *Clostridium*,  
 15 *saccharoperbutylaceticum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tyrobutiricum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* o *Lactobacillus Brevis*.
- 20 7. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque es productora de alcoholes.
8. Una célula de acuerdo con la reivindicación 7 caracterizada porque es productora de etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-  
 25 butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-  
 30 hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol decanol, dodecanol o combinaciones de los mismos .
9. Una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque es productora de butanol.

10. Un método para producir una célula o células bacterianas con asimilación deficiente de alcoholes de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:

- a) Seleccionar una célula bacteriana con capacidad de asimilar alcoholes como fuente de carbono,
- 5 b) inducir una mutagénesis dirigida o aleatoria en al menos uno de genes *glcB*, *aceA*, *gluQ*, *rpoZ*, *dusB* o de algún gen con al menos un 90% de homología o identidad con las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 en dichas células y
- c) opcionalmente, aislar los clones mutantes.

10

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 donde la célula con capacidad de asimilar alcoholes se selecciona de entre células de los géneros: *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*,  
15 *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Treponema*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Geobacillus*, *Ureobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Nocardia*, *Synechocistis*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces* *Thermoanaerobacterium* o *Zymomonas*.

20

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 o 11 donde la célula con capacidad de asimilar alcoholes se selecciona de entre células de las especies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijeirinkii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium belfantii*, *Clostridium*,  
25 *saccharoperbutylaceticum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tyrobutiricum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Escherichia coli*, *Entorococcus faecium* o *Lactobacillus Brevis*.

30

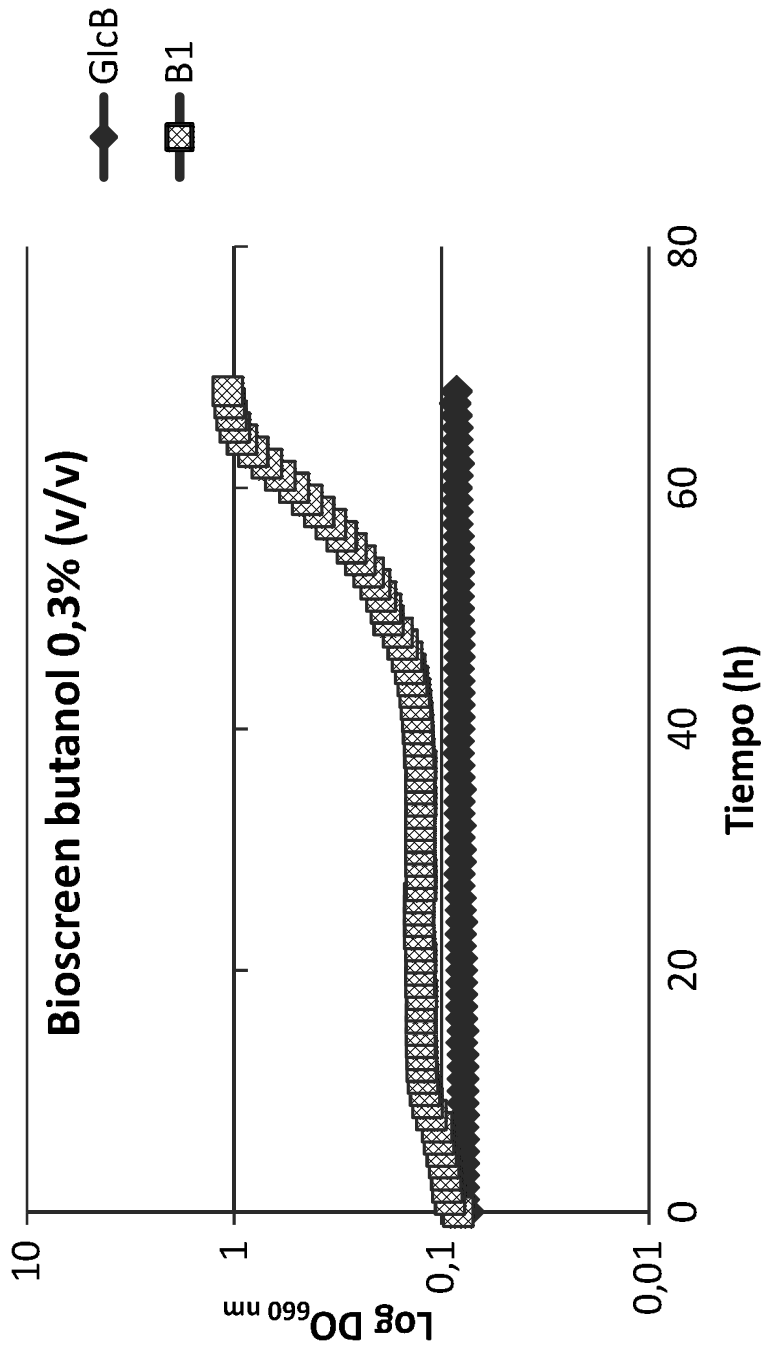
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 donde la mutagénesis aleatoria se lleva a cabo mediante inserción de transposones.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 donde el aislamiento de los clones mutantes se lleva a cabo mediante crecimiento diferencial en medios con alcoholes como fuente de carbono frente a otras fuentes de carbono alternativas.

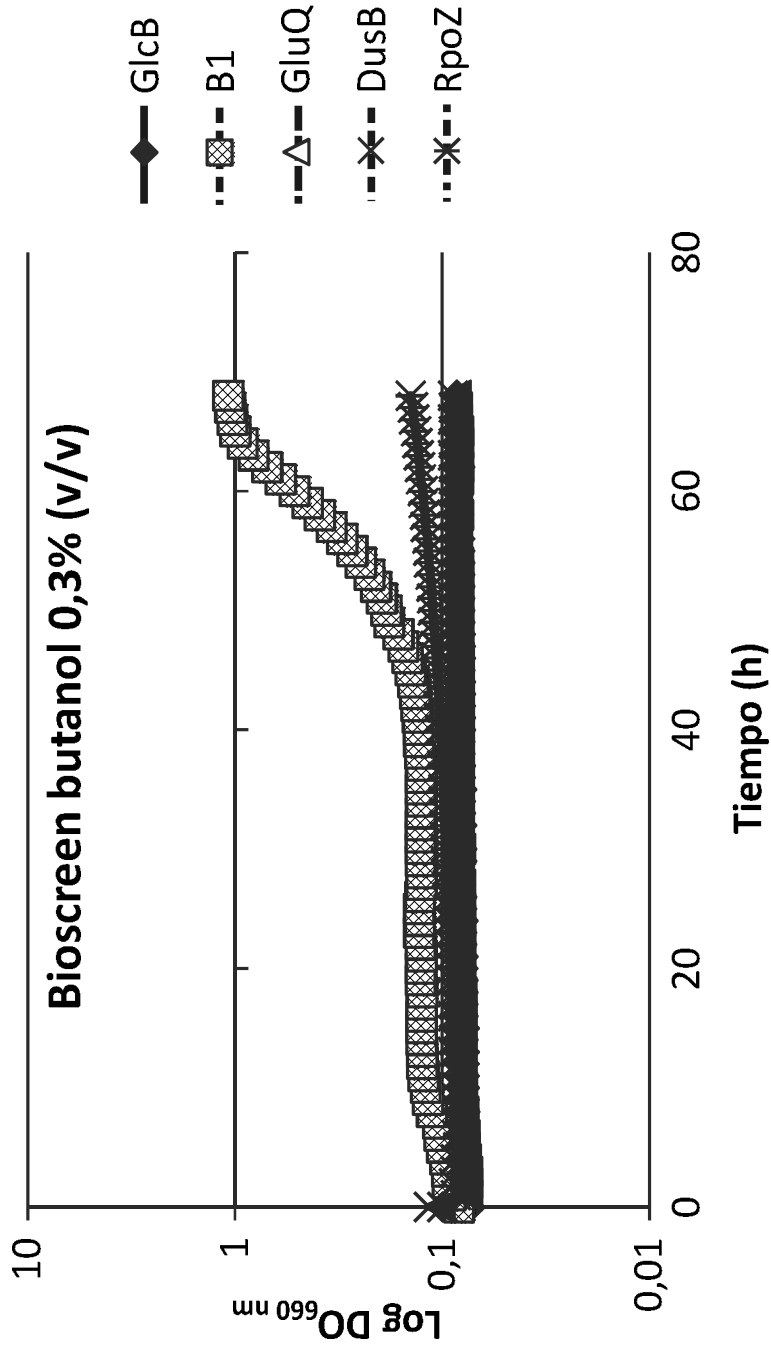
35

15. Una composición microbiológica para producir alcoholes que comprende células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y opcionalmente al menos un elemento adicional que favorezca la producción de alcoholes.
- 5 16. Un composición microbiológica de acuerdo con la reivindicación 15 donde el elemento adicional que favorece la producción de alcoholes es un medio rico en azúcares fermentables, un microorganismo adicional que actúe sinérgicamente en la producción de alcoholes, una enzima o enzimas que actúen sinérgicamente en la producción de alcoholes o una combinación de los mismos.
- 10 17. Uso de una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16 para la producción de alcoholes.
- 15 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17 donde el alcohol se selecciona entre etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-  
20 pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol decanol, dodecanol o combinaciones de los mismos .
- 25 19. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 o 18 donde el alcohol es butanol.
- 30 20. Un procedimiento para producir alcoholes que comprende:  
a) incubar la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 o una composición microbiológica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en presencia de azúcares fermentables,  
b) recuperar los alcoholes producidos en la etapa a).
- 35 21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20 donde el azúcar fermentable es glucosa.

22. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21 donde la célula es *Pseudomonas putida* o donde la composición microbiológica comprende *Pseudomonas putida*.
- 5 23. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 donde el alcohol producido es butanol.



**FIG. 1A**



**FIG. 1B**

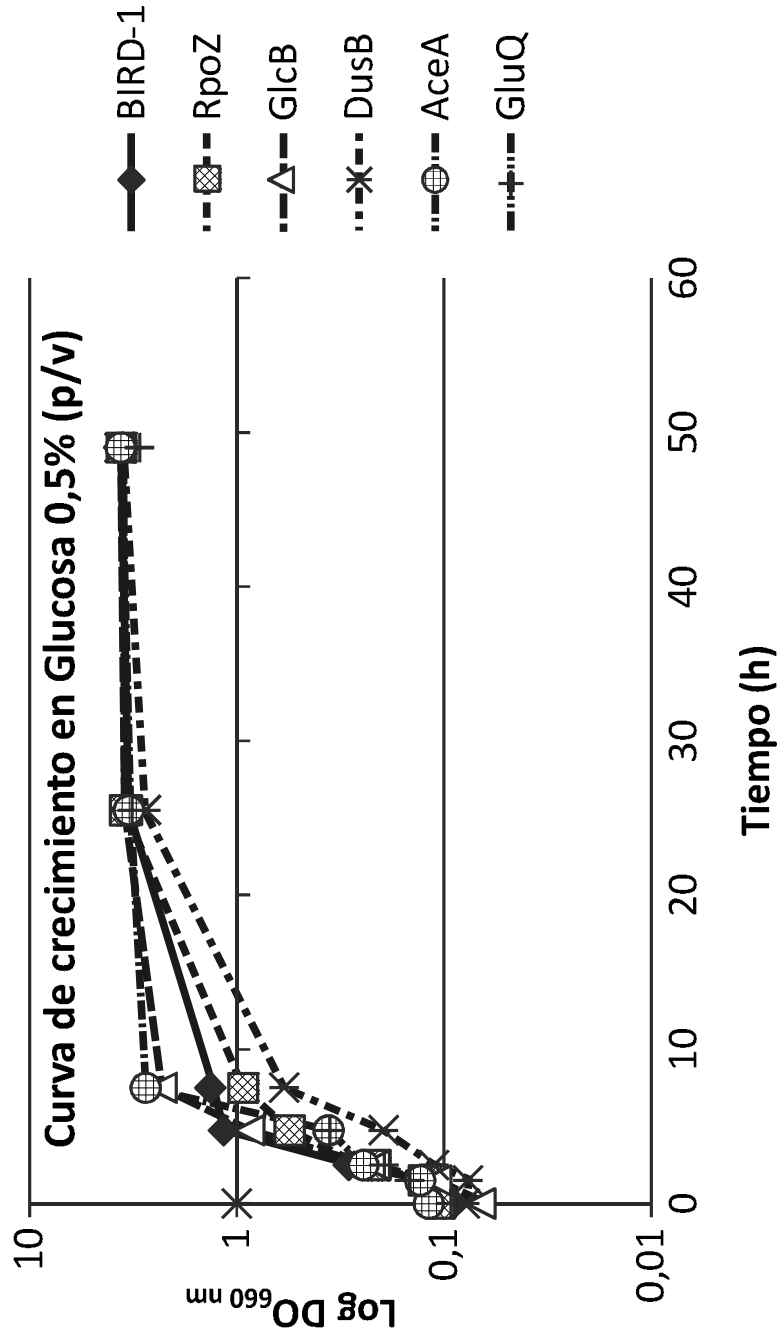


FIG. 2A

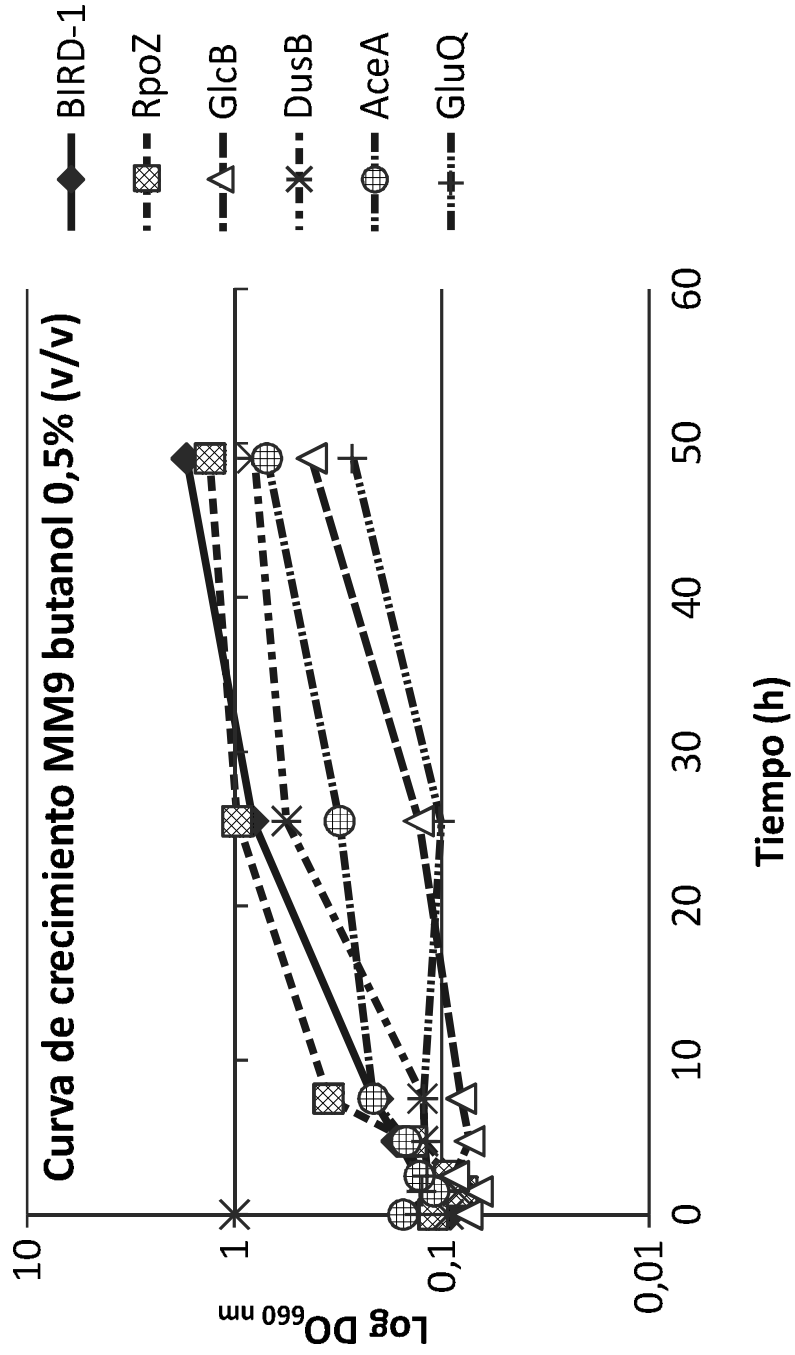
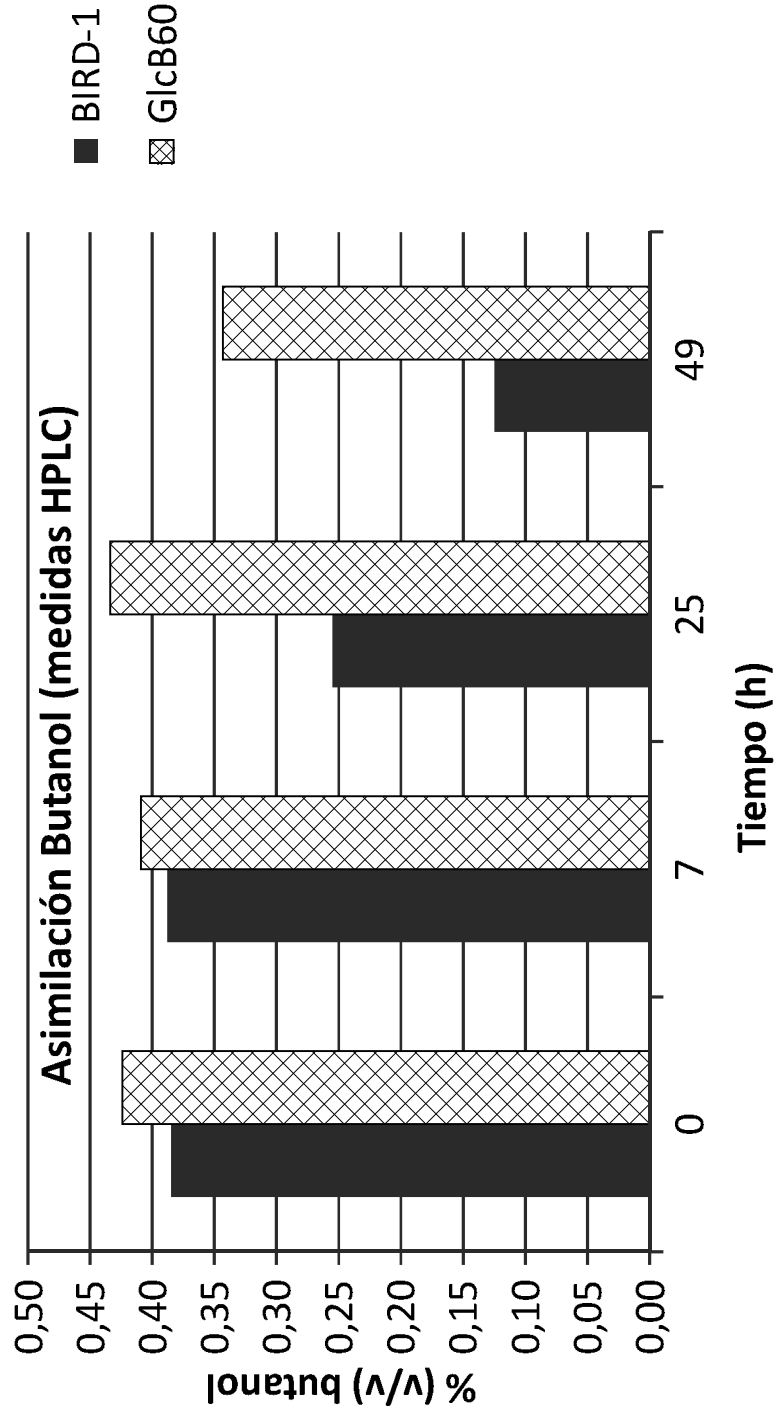


FIG. 2B





**FIG. 2C**

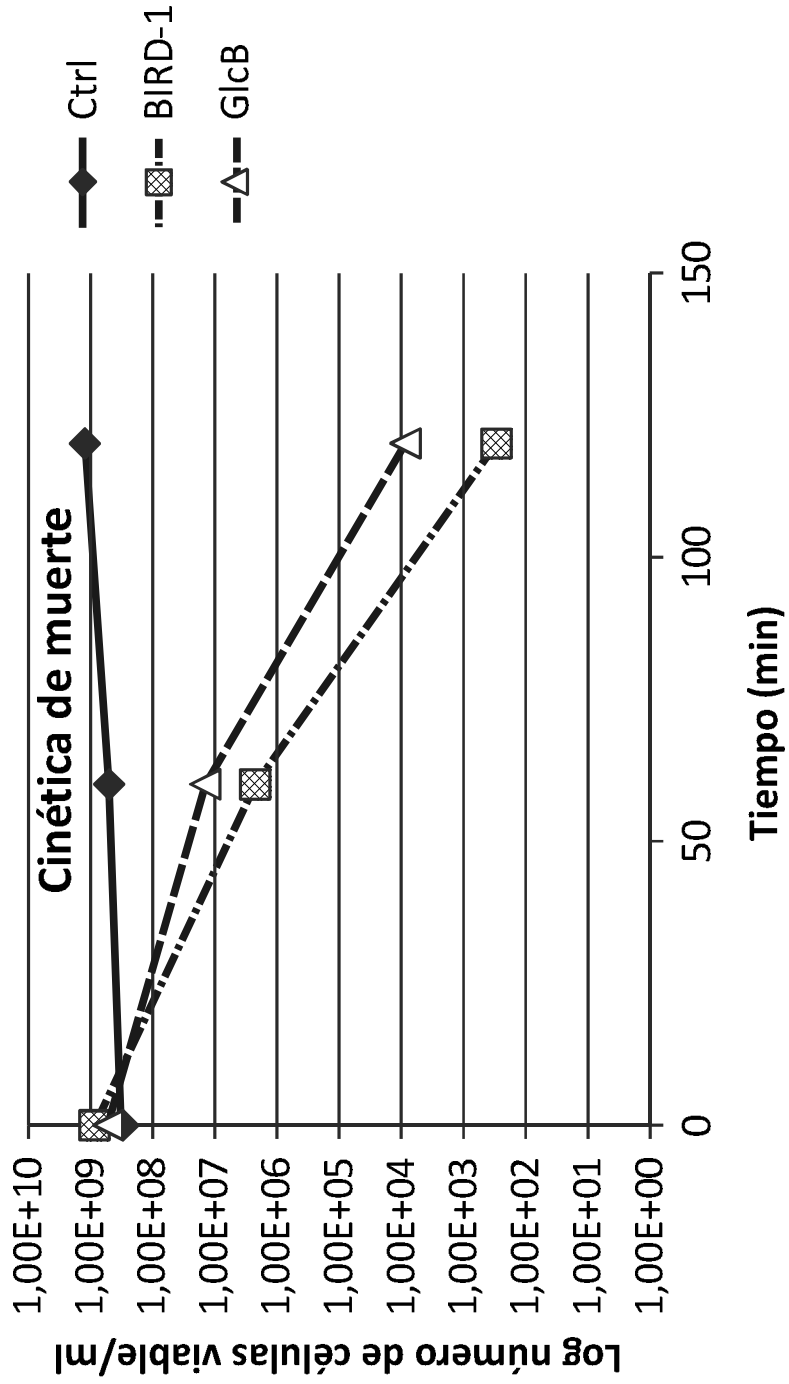
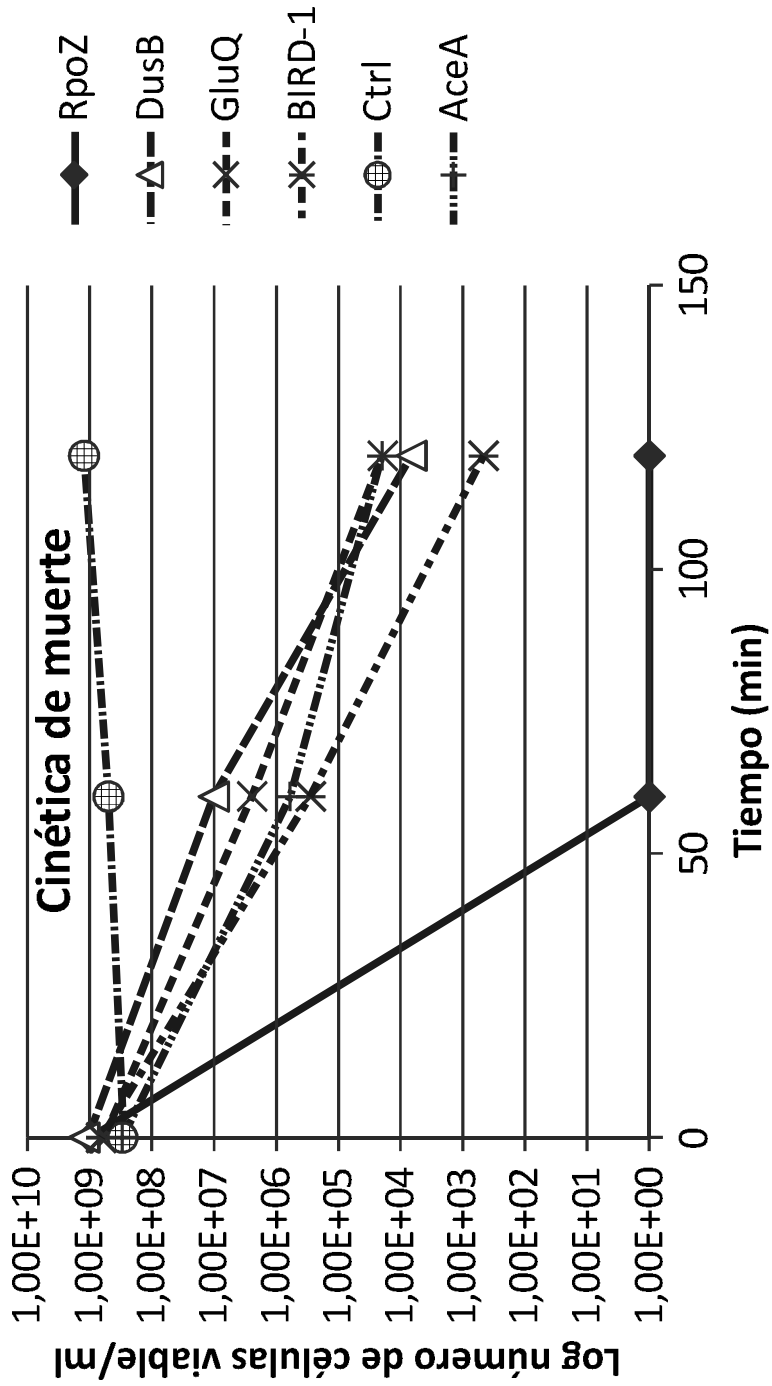


FIG. 3A



**FIG. 3B**

# ES 2 573 958 B1

## Listado de Secuencias

<110> Abengoa Research S.L.  
 <120> BACTERIA MODIFICADA GENÉTICAMENTE DEFICIENTE EN LA ASIMILACIÓN DE ALCOHOLES  
 <130> 168/14  
 <160> 6  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 2178  
 <212> DNA  
 <213> Pseudomonas putida  
 <400> 1  
 atgactggat acgttcaagt cgggtgcctt caggtcgcca aggtcctgta cgacttcgtg 60  
 aacaacgaag ccatccccgg gaccggcatc gtcgccgagc agttctgggc ggggtgcagag 120  
 aagatcatca atgacctcgc tccaaagaac aaagccctgc tcgccaagcg cgacgagctg 180  
 caagccaaga tcgacgcctg gcaccaggca cgcaaaggcc aggcccacga cgccgcagcc 240  
 taaaaagcat tcctccagga aatcggctac ctgctgccac aagccgacga tttccaggcc 300  
 accaccaga atgtggacga agaaatcgcc cacatggccg gtccacaact ggctcgtgccg 360  
 gtgatgaacg cccgcttcgc cctgaacgcc gccaacgccc gctgggggttc gctgtacgat 420  
 gccctgtacg gcaccgacgc catcagcgat gaaggcggcg ccgaaaaagg ccagggttac 480  
 aacaagatac gcggcgacaa ggtcatcgcc ttcgcccgcg ccttcctcga cgaagccgcg 540  
 cactggccg ccggctcgca cgtcgactcc acgggctatc gcatcgaagg cggcaagctg 600  
 gttgttgccc tgaaaggcgg cagcaacact ggcctacgcg acgatgcgca actgattggc 660  
 ttccacggcg acgccgccg gccactgct gtgctgctca agcacaacgg cctgcacttc 720  
 gaaatccagg tcgatgccag caccgccgtc ggcagaccg acgccgctgg cgtcaaagac 780  
 atcctgatgg agtcggcact gaccaccatc atggactgcg aagactcggg tgcagccgtc 840  
 gacgctgacg acaaagtcac cgtctaccgc aactggctgg gcttgatgaa aggcgacctg 900  
 gccgaaagcg tgagcaaggg tggcaaaacc ttcaccgcga ccatgaacct ggaccgcgag 960  
 tacgctgcg ctaacggcgg cagcgtgacc ctgcacggtc gttcgttgct gttcgtgcg 1020  
 aacgttgccc acctgatgac caaccggcg atcctcgatg cccagggcaa cgaaatcccc 1080  
 gaaggatcc aggacgggct gttaccaac ctgatcgccc tgcacaatct caacggtaac 1140  
 actagccgca agaatacccg cagcggcagc gtgtacatcg tcaagccgaa gatgcacggc 1200  
 cctgaggaag tggccttcgc cgccgagatc ttcagccagg tcgaagacct gctgggcatg 1260  
 ccgcgcaaca ccgtcaaggt cggcatcatg gacgaggaac gccgtaccac ggtcaacctc 1320  
 aaatcctgca tcaaggcagc cgccgagcgc gtggcgttca tcaataccgg cttccttgac 1380  
 cgactggag atgaaatcca cacctcgatg gaagccggcg ccgtggtgcg caaaggtgcc 1440  
 atgaagaacg agaagtggat cggcgcctac gaaaacaaca acgtcgacgt tggcctggcc 1500

ES 2 573 958 B1

accggcctgc aaggccgtgc gcagatcggc aaaggcatgt gggccatgcc tgacctgatg 1560  
gccgccatgc tcgagcagaa gatcgcccac cactggccg gtgccaacac cgcctgggta 1620  
ccgtcgcaa ctgccgccac cctgcacgcc ctgcactacc acaagggtgga cgtacaggcg 1680  
cgccagcgtg aactggcttc acgtaccccg gcgtcgggtg atgacattct ggccattccg 1740  
ctggctgccc acaccaactg gtcggccgaa gagatccgca acgagctgga caacaacgcc 1800  
cagggcattc tcggctacgt ggtgcgctgg atcgaccagg gcgtgggttg ctcgaaggtg 1860  
ccggacatca acaacgtcgg cctgatggaa gaccgtgcca ccctgcgcat ctccgccag 1920  
ctgctggcca actggctgcy ccacggcgtg gtcagccagg aacaggtgct ggaaagcctc 1980  
aagcgcattg ccgtgggtgt cgatcagcag aacgctggcg accccctgta ccgcccgatg 2040  
gcgccgaatt tcgacgaaa cgtggcgctc caggcggctg tggaaactggt agtggaaaggt 2100  
ggcaagcaac cgaacggta taccgagccg gtactgcacc gccgtcgccg cgagttcaag 2160  
gcgcgtaacg ggttgtaa 2178

<210> 2  
<211> 1326  
<212> DNA  
<213> Pseudomonas putida

<400> 2  
atggcactga cacgcgaaca gcaaattgca gccctcgaga aagactgggc cgagaacccg 60  
cgctggaaag gcgtgacccg tacctacacc gccgctgatg tcgttcgcct gcgtggctcc 120  
gtgcaacctg agcacacctt tgcccgccag ggtgcagaaa aactgtggaa gctggttacc 180  
gaagtgctc acccgtcctt ccgccccgac aaagatttcg tcaactgcat gggcgcccta 240  
actggcggcc aggctgtaca acaggtcaag gccggtatcc aggccatcta cctgtccggc 300  
tggcaggttg ccgccgaaa caactcggcc gagtcgatgt accctgacca gtcgctgtac 360  
ccggtcgatt cggtagccg cgtgggtcaag cgcatcaaca acgcttccg ccgtgccgac 420  
cagatccagt ggaaagccgg caagaacccg ggcgacgaag gctacatcga ctacttcgcy 480  
cccatcgtgg ccgacgccga agccggtttt ggcggcgat tgaatgccta cgagctgatg 540  
aagaacatga tcgaagcagg cgcggccggc gtgcacttcg aagaccagct ggcctcggtt 600  
aaaaaatgcy gccacatggg cggcaaggty ctggtaccga cccaggaagc cgtacagaag 660  
ctggtagcag cgcgcctggc cgctgacgtg tcgggtgtgc cgaccatcat cctggcccgc 720  
accgacgcca acgcccga cctgctgacc agcgactgcy acccgtaga ccagccgctc 780  
gtgattggcy agcgcacccg tgaaggcttc tacaaggctc gtgccggcct cgaccaggcc 840  
attgcccgcg gcctggccta cgcgccgtac gccgacctga tctggtgtga aaccgccaag 900  
ccagacctg acgaagcccg tcgcttcgcc gaggcgatca agaaggagta cccggaccag 960  
atcctgtcgt acaactgctc gccttcctc aactggaaga aaaacctgga cgacgccacc 1020  
atcgccaagt tccagcgcga attgtcggcc atgggttaca agcatcagtt catcacctg 1080  
gccggcatcc acaacatgtg gcacggcatg ttcaacctgg cgcacgacta cgcccgaac 1140

ES 2 573 958 B1

gacatgaccg cctacgtgaa gctgcaggag caggaattcg ctgacgccag caagggctac 1200  
 accttcgtgg cgcaccagca ggaagtgggc actggctact tcgacgacat gaccaccgtg 1260  
 atccagggtg gcgcttcgtc ggtgactgcg ctgaccggtt cgaccgagga agagcagttc 1320  
 cactga 1326

<210> 3  
 <211> 903  
 <212> DNA  
 <213> Pseudomonas putida

<400> 3  
 atgccagcc tgaccatgac cgactccagc tacatcgggc gtttcgcccc cccccccagc 60  
 ggcttcctgc acttcggctc gctggtcgcc gccctcgctt cgtggctcga tgcccgcgct 120  
 gtcaacggcc gctggctgct gcgcatggaa gacaccgacc cgccccggga gatgcccggc 180  
 gcccgcgatg ccatcctcca gacgctggaa cgttacggcc tgcaatggga tggcgaggtg 240  
 gtattccaga gccagcgcca cgatgcctat gctgccgtgg tagaccgcct gttcaacatg 300  
 ggcttgccgt acgcatgcac ctgctcgcgc aagcagctgg aacgctacaa cggcatctac 360  
 ccgggctttt gccgcaacgc cgggcatgcc cgtgaagggg cagccatccg cttgcgggtg 420  
 ccagagctga tctaccgctt taccgaccga gtgcaggggtg aataccagca acacctgggg 480  
 cgtgaggtgg gcgatttcgt catccagcgt cgtgatgggt tgtacgccta ccagctggcc 540  
 gtggtgctgg acgatgcctg gcaggggtgtt accgacatcg tgcgtggcgc cgacctgctc 600  
 gacaacaccc cgcgccagct gtacctgcag gagttgctgg gcttctcaca gccgcgttac 660  
 ctgcatattc cgctgatcgt gcagccgat gggcacaagc tgggcaagtc gtaccgttcg 720  
 ccgccactgc aggcgagca tgctaccccc ctgctgctgc gggcattgcg ggcgctgggg 780  
 caggagacag acccggaact gctgttggcg acaccggcag agatgctggc agtcgcgcgc 840  
 acgcaatggc ggccggatgc gatcgcgcag cggaccacgg tgccagaggc tgatctgcgc 900  
 tga 903

<210> 4  
 <211> 264  
 <212> DNA  
 <213> Pseudomonas putida

<400> 4  
 atggcccgcg taactgttga agactgcctg gaacacgtgg ataaccgctt tgagctggtc 60  
 atgctctcga ccaagcgcgc tcgccagctg gcgaccggcg gcaaagagcc acgcgttgcg 120  
 tgggaaaacg acaagccaac cgttgttgcc ctgctgtaaa ttgccgaagg catcgtcacc 180  
 aacgagttca tcgccgctga agagatcgtc accgaggatc cgggtgttcgc cgcgttcgag 240  
 gacgagaaca acgaggctgt ctga 264

<210> 5  
 <211> 1014  
 <212> DNA  
 <213> Pseudomonas putida

ES 2 573 958 B1

<400> 5  
atgtcggcgg tacgcatcgg ccaatacaca ctacgtaaca acctgacct cgcgcccatg 60  
gccgggggtca cggaccagcc tttccgtaca ctttgccagc gcctgggagc cggcatgggtg 120  
gtgtcggaaa tggtaagcag cgacatgagc ctgtggaaca gccgcaagtc gagcctgcgc 180  
cgcatccatg aaggatgatcc cgagccagc tcggtgcaga tcgccggcgg tgatgcgcag 240  
atgatggcag cggcggcaaa ggccaatgtc gaagcaggtg cccagatcat cgacatcaac 300  
atgggctgtc cggcaaaaa agtctgcaac aaagccgcag gctctgcttt attgagagat 360  
gaagccttgg tcagttagat cctccacgcc gtggtcagcg ccgtggacgt accggtgacc 420  
ctgaaaatcc gcaccggctg ggaccgggag aacaagaacg gcctgaacgt ggcgaagatc 480  
gccgaacagg ctggcatcca ggcgctggcg gtgcatggcc gcacacgtgc cgacctgtac 540  
accggcgaag ccgagtacga caccatcgct gccatcaagc aggcgggtgtc aatcccggtt 600  
tttgccaacg gcgatatcac ctcgccagaa aaggcccggg cgggtgctgga aaccaccggg 660  
gtcgatggcc tgttgattgg ccgggctgcc caggggagcg catggatctt tcgagagatc 720  
gagcattacc tgcgactgg cgaacatctg ccagcgccgc aactggacga agtggaacgc 780  
atcctgctgg agcatctggc cgcgctgcat gccttctatg gcgatgtgat gggcgtacgt 840  
atcgcccgca agcacgttgg ctggtacctg gcaacacgac ccggcggcaa ggagtttctc 900  
gcccggttca acgctttgga agacacaaa gcgcagtgcg ccaacgttcg cgcgtttttc 960  
agcgaacgtc gacagagcct tgagacagag gacggacaag gggtagccgc atga 1014

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador TNINT

<400> 6  
aggcgatttc agcgaagcac 20



21 N.º solicitud: 201431826

22 Fecha de presentación de la solicitud: 12.12.2014

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2012040440 A1 (ALSAKER et al.) 16.02.2012, todo el documento.	1-23
A	SCHWARZ, K.M. et al., 'A transcriptional study of acidogenic chemostat cells of Clostridium acetobutylicum--cellular behavior in adaptation to n-butanol', JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 2012, Vol. 161, No. 3, Págs 366-377, ISSN: 0168-1656(print), ISSN: 1873-4863(electronic), doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.03.018, todo el documento.	1-23
A	MA, C. et al., 'Comparative proteomics analysis of high n-butanol producing metabolically engineered Clostridium tyrobutyricum', JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 2015 Enero, Vol. 193, Págs 108-119, ISSN: 0168-1656(print), ISSN: 1873-4863(electronic), doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.10.036, Epub.: 05.11.2014, todo el documento.	1-23
A	MATILLA, M.A. et al., 'Complete Genome of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Pseudomonas putida BIRD-1', JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2011, Vol. 193, No.5, Pág. 1290, ISSN: 0021-9193(print), ISSN: 1098-5530(electronic), doi: 10.1128/JB.01281-10, todo el documento.	1-23
A	UDAONDO, Z. et al., 'Metabolic potential of the organic-solvent tolerant Pseudomonas putida DOT-T1E deduced from its annotated genome', MICROBIAL BIOTECHNOLOGY, 2013, Vol. 6, No. 5, Págs 598-611, ISSN: 1751-7907(print), ISSN: 1751-7915(electronic), doi: 10.1111/1751-7915.12061, todo el documento.	1-23
A	US 2007218533 A1 (GILL et al.) 20.09.2007, todo el documento.	1-23
A	US 2007259411 A1 (BRAMUCCI et al.) 08.11.2007, todo el documento.	1-23

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
12.05.2015

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/4



## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/21** (2006.01)

**C12N15/52** (2006.01)

**C12N15/63** (2006.01)

C12P7/16 (2006.01)

C12R1/40 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.05.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2012040440 A1 (ALSAKER et al.)	16.02.2012
D02	SCHWARZ, K.M. et al., <i>J. Biotechnol.</i> , (2012), 161(3): 366-77.	2012
D03	MA, C. et al., <i>J. Biotechnol.</i> , (2015 Enero), 193:108-19.	05.11.2014
D04	MATILLA, M.A. et al., <i>J. Bacteriol.</i> , (2011), 193(5):1290.	2011
D05	UDAONDO, Z. et al., <i>Microb. Biotechnol.</i> , (2013), 6(5): 598-611.	2013
D06	US 2007218533 A1 (GILL et al.)	20.09.2007
D07	US 2007259411 A1 (BRAMUCCI et al.)	08.11.2007

En D01-D07 se divulgan diferentes bacterias modificadas genéticamente tolerantes a solventes orgánicos, en particular, alcoholes alifáticos.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1 Reivindicación independiente 1 y 20.

1.1.1. El objeto de las reivindicación independiente 1 consiste en una célula bacteriana genéticamente modificada caracterizada porque presenta una expresión reducida de al menos uno de los genes *glcB* (SEQ ID NO 1), *aceA* (SEQ ID NO 2), *gluQ* (SEQ ID NO 3), *rpoZ* (SEQ ID NO 4), *dusB* (SEQ ID NO 5) o un gen con al menos un 90% de homología o identidad con las secuencias SEQ ID NO 1 a 5. La reivindicación 20 trata de un procedimiento para producir alcoholes que comprende incubar la célula bacteriana de la reivindicación 1 en presencia de azúcares fermentables y recuperar los alcoholes producidos.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D07, se han caracterizado diferentes microorganismos modificados genéticamente tolerantes a solventes orgánicos, en particular, n-butanol. Sin embargo, ninguno comparte las características técnicas de la célula bacteriana reivindicada en la solicitud. Además, dicha célula no se deduce de una manera obvia combinando la información descrita previamente en este campo de la técnica. Por consiguiente, el método reivindicado en la solicitud de patente se considera nuevo e inventivo sobre la base de los documentos D01-D07.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-23 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.