

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 980**

51 Int. Cl.:

C12P 7/56 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2006 E 10186896 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2305826**

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

30 Prioridad:

10.08.2005 US 706887 P

24.01.2006 US 761576 P

11.05.2006 US 799619 P

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

13.06.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)**

**223 Grinter Hall
Gainesville, FL 32611, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 573 980 T3

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

DESCRIPCIÓN

Materiales y métodos para la producción eficaz de ácido láctico

5 Antecedentes de la invención

[0001] El ácido láctico se usa comúnmente como un aditivo alimenticio para la conservación, sabor, y acidez. El ácido láctico también se usa en la producción de plástico biodegradable, es decir ácido poliláctico (PLA). El uso de PLA como una alternativa renovable a los productos a base de petróleo se está extendiendo rápidamente (Agrawal, 2003).

10 Las propiedades físicas y el índice de degradación biológica del PLA se pueden controlar mediante la manipulación de la proporción de los sustratos quirales, el ácido D-láctico y el ácido L-láctico (Narayanan et al., 2004).

15 Se estima que el mercado global de ácido láctico tiene un excedente de 100.000 toneladas por año y está previsto que aumente considerablemente en los siguientes años a medida que las nuevas fábricas de PLA se vuelven operativas.

[0002] Por ejemplo, se espera que la demanda del solvente biodegradable lactato de etilo (un derivado del ácido láctico) aumentará considerablemente en un futuro cercano.

20 Se ha estimado que los ésteres de lactato potencialmente podrían reemplazar tanto como el 80% de las 3,8 millones de toneladas de solventes que se usan cada año en EEUU. Este solvente no es tóxico y tienen muchas aplicaciones útiles, incluyendo en la fabricación electrónica, en pinturas y recubrimientos, en tejidos, limpiadores y desengrasantes, adhesivos, impresión, y destintado.

[0003] Los métodos fermentativos para la producción de ácido láctico a menudo se prefieren a la síntesis química, que produce una mezcla de isómeros D y L.

25 Los productos de fermentaciones microbiológicas dependen del organismo usado.

La fermentación microbiológica puede producir una mezcla de los dos isómeros o ácido láctico ópticamente puro en una forma estereoespecífica.

30 La estereoespecificidad deseada del producto depende del uso previsto.

[0004] Las fermentaciones bacterianas con lactobacilos son comunes para producción industrial de ácido láctico, pero estas fermentaciones raramente producen un producto ópticamente puro.

Adicionalmente, la naturaleza exigente de estas bacterias requiere que se añadan cantidades considerables de nutrientes adicionales al medio de cultivo, lo que suma costes adicionales y hace la purificación más difícil.

35 Además, los métodos de fermentación para producir ácido láctico son altamente ineficientes y deben ser mejorados para asegurar la viabilidad económica de las expansiones de mercado previstas anteriormente mencionadas.

[0005] Las levaduras no son capaces de producir niveles apreciables de ácido láctico, aunque se han descrito cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes que contienen el gen de la LDH de orígenes *Lactobacillus* o bovinos (Patente WO 99/14335 y Adachi et al., 1998).

40 A la vez que son capaces de producir hasta 2-4% ácido láctico de (p/v), estas cepas presentan una baja productividad y una parte significativa de la glucosa se convierte en etanol.

[0006] El hongo filamentoso *Rhizopus oryzae* (sin. *R. Arrhizus*) también se usa para la producción industrial de ácido láctico.

45 *R. Oryzae* es capaz de convertir aeróbicamente la glucosa, en un medio químicamente definido, en grandes cantidades de ácido L-(+)-láctico ópticamente puro.

La investigación sobre la producción de ácido láctico por *Rhizopus* ha continuado principalmente debido a la facilidad de purificación del producto en un medio de cultivo mínimo y a la capacidad del hongo para utilizar tanto

50 carbohidratos complejos como azúcares de pentosa (Patente de EEUU nº 4,963,486). Esto permite que el hongo sea utilizado para la conversión de biomasa agrícola de bajo valor en ácido láctico. Desafortunadamente, la capacidad para modificar la producción de ácido láctico por modificación genética en *Rhizopus* y otros hongos ha sido limitada.

[0007] Se han diseñado biocatalizadores basados en *Escherichia coli* K-12 para la producción de D-(-)-lactato, pero fueron incapaces de fermentar un 10% de glucosa o sacarosa completamente en un medio complejo o mínimo (Chang et al., 1999; Dien et al., 2001; Zhou et al., 2003; Zhu y Shimizu 2004).

[0008] Uno de los biocatalizadores de *E. coli*, SZ63 (pLOI3501), fue desarrollado para la fermentación de sacarosa mediante la expresión funcional de los genes *cscR' cscA' cscKB'* de *E. coli* B en un plásmido (Shukla et al. 2004).

60 Aunque fue capaz de realizar una fermentación eficaz de un 5% de glucosa o sacarosa, concentraciones de azúcar más elevadas fueron metabolizadas de forma incompleta por este biocatalizador y fue necesaria una selección antibiótica continua para el mantenimiento plasmídico.

[0009] Otros biocatalizadores derivados de la cepa B de *E. coli*, como por ejemplo K011 (Depósito nº ATCC 55124), tienen la capacidad nativa para fermentar sacarosa (Moniruzzaman et al., 1997). Como con la cepa SZ63, las

concentraciones de azúcar más elevadas son metabolizadas de forma incompleta por este biocatalista, y es necesaria una selección antibiótica continua para el mantenimiento plasmídico.

5 [0010] Por consiguiente, todavía existe una necesidad de biocatalizadores de ácido láctico mejorados con mayores índices de fermentación, título de producto, y rendimientos para reducir los costes asociados a la producción de base biológica de productos químicos comerciales (Arntzen et al., 1999; Chotani et al., 2000; Datta et al., 1995; Hofvendahl y Hahn-Hagerdal, 2000; y Ohara et al., 2001).

Breve resumen de la invención

10 [0011] La presente invención proporciona microorganismos nuevos tal y como se define en la reivindicación 1 anexa a esta descripción, que son útiles en la producción de ácido láctico.

15 Adicionalmente, la presente invención proporciona nuevos constructos para usar en la transformación de *Escherichia coli*, para expresar y/o suprimir ciertos genes para producir ácido láctico cuando el organismo huésped se cultiva en un medio fermentable.

Por consiguiente, los materiales y métodos de la presente invención pueden utilizarse para mejorar la producción de ácido láctico en *Escherichia coli*, proporcionando así un suministro aumentado de ácido láctico para usar en el alimento y aplicaciones industriales.

20 [0012] En formas de realización determinadas, se construyen derivados de *Escherichia coli* etanológica (también denominada en este documento como *E. coli*) K011 para la producción de D-(-)-lactato.

En otras formas de realización de la invención, se modifican genéticamente *E. coli* conforme a la presente invención para la producción de L-(+)-lactato.

25 [0013] Conforme a la presente invención, los nuevos biocatalizadores basados en *E. coli* K011 se preparan eliminando los genes que codifican vías rivales seguido de una selección basada en el crecimiento para mutantes con rendimiento mejorado para la fermentación de glucosa y/o sacarosa.

30 [0014] Los microbios genéticamente modificados de la invención preferiblemente contienen genes nativos para la utilización de sacarosa.

Determinadas cepas de *E. coli* genéticamente modificadas de la invención pueden fermentar un 10% de glucosa o sacarosa para producir más de 1 mol de D-(-)-lactato/1 caldo de fermentación, con rendimientos basados en azúcar metabolizado que varían de aproximadamente un 88% a aproximadamente un 95%, dependiendo del caldo de fermentación.

35 Otras cepas de *E. coli* modificadas genéticamente de la invención pueden fermentar glucosa o sacarosa para producir L-(+)-lactato.

[0015] Otras ventajas adicionales de esta invención serán aparentes con la descripción que sigue.

40 Breve descripción de las figuras

[0016]

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

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

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

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

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

Breve descripción de las secuencias

55 [0017]

SEC ID N°: 1 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la eliminación de *frdBC*.

SEC ID N°: 2 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la eliminación de *frdBC*.

SEC ID N°: 3 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la eliminación de *adhE*.

60 SEC ID N°: 4 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la eliminación de *adhE*.

SEC ID N°: 5 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la eliminación de *celY*.

SEC ID N°: 6 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la eliminación de *celY*.

SEC ID N°: 7 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la eliminación de *mgsA*.

SEC ID N°: 8 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la eliminación de *mgsA*.

65 SEC ID N°: 9 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la amplificación de FRT-*cat-sacB*.

SEC ID N°: 10 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la amplificación de FRT-*cat-sacB*.

SEC ID N°: 11 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la amplificación de *cat-sacB* con sitio *NheI* 5'.

SEC ID N°: 12 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la amplificación de *cat-sacB* con sitio *NheI* 5'.

SEC ID N°: 13 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la clonación de *frdABCD*.

SEC ID N°: 14 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la clonación de *frdABCD*.

SEC ID N°: 15 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la clonación de *ackA*.

SEC ID N°: 16 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la clonación de *ackA*.

SEC ID N°: 17 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la clonación de *lacZ-cynX*.

SEC ID N°: 18 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la clonación de *lacZ-cynX*.

SEC ID N°: 19 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la clonación de *mgsA*.

SEC ID N°: 20 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la clonación de *mgsA*.

SEC ID N°: 21 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la clonación de *focA-pflB*.

SEC ID N°: 22 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la clonación de *focA-pflB*.

SEC ID N°: 23 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para la clonación de *adhE*.

SEC ID N°: 24 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para la clonación de *adhE*.

SEC ID N°: 25 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para eliminar *frdBC*.

SEC ID N°: 26 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para eliminar *frdBC*.

SEC ID N°: 27 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para eliminar *ackA*.

SEC ID N°: 28 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para eliminar *ackA*.

SEC ID N°: 29 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido *lacZ* con sitio *NheI* 5'.

SEC ID N°: 30 es la secuencia de nucleótidos para un cebador *cynX* antisentido con sitio *NheI* 5'.

SEC ID N°: 31 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para eliminar *mgsA*.

SEC ID N°: 32 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para eliminar *mgsA*.

SEC ID N°: 33 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para eliminar *focA-pflB*.

SEC ID N°: 34 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para eliminar *focA-pflB*.

SEC ID N°: 35 es la secuencia de nucleótidos para un cebador sentido para eliminar *adhE*.

SEC ID N°: 36 es la secuencia de nucleótidos para un cebador antisentido para eliminar *adhE*.

SEC ID N°: 37-46 representan la secuencia parcial de las regiones genéticas en las que se eliminaron cicatrices FRT. Las secuencias parciales de las regiones 5' y 3' del/de los gen(es) se muestran en negrita, la cursiva se utiliza para designar la cicatriz FRT y la región subrayada fue eliminada en la cepa TG128.

35 Descripción detallada de la invención

[0018] La presente invención proporciona microorganismos nuevos que son capaces de producir ácido láctico cuando se cultivan en una variedad de condiciones de fermentación.

La presente invención también proporciona métodos para modificar genéticamente tales microorganismos, así como métodos para producir de forma eficaz y estable ácido láctico utilizando los microbios nuevos de la invención, de modo que se proporciona una producción elevada de ácido láctico a partir de productos crudos relativamente económicos tales como glucosa o sacarosa.

[0019] El término "ácido láctico" en esta solicitud se refiere al ácido 2-hidroxiopropanoico ya sea en forma libre o en forma de sal.

A la forma de sal del ácido láctico se hace referencia como "lactato" independientemente del agente de neutralización, es decir, carbonato cálcico o hidróxido amónico.

Tal y como se hace referencia a él en este documento, el ácido láctico puede referirse a cualquiera de las formas estereoisoméricas del ácido láctico ácido (L-(+)-láctico o ácido D-(-)-láctico).

El término lactato puede referirse a cualquiera de las formas estereoisoméricas del lactato L-(+)-lactato o D-(-)-lactato).

La presente invención proporciona microbios que producen un único estereoisómero de ácido láctico o lactato.

El estereoisómero de ácido láctico o estereoisómero de lactato que se produce conforme a algunos aspectos de esta invención es "quiralmente puro".

La frase "quiralmente puro" indica que no hay contaminación detectable de una forma estereoisomérica de ácido láctico o lactato con la otra forma estereoisomérica (la pureza quiral del estereoisómero específico es al menos, mayor de (o mayor de o igual a) 99,9%). Los microorganismos genéticamente modificados que se describen aquí a los que se les ha eliminado o desactivado la vía metilgloxal (*mgsA*) son capaces de producir ácido D-(-)-láctico o ácido L-(+)-láctico "quiralmente puro".

[0020] Para ciertas formas de realización de la invención, el ácido L-(+)-láctico se produce utilizando los microbios modificados genéticamente de la invención.

En otras formas de realización de la invención, el ácido D-(-)-láctico se produce utilizando los microbios modificados genéticamente de la invención.

[0021] En una forma de realización, la invención usa *Escherichia coli* (o *E. coli*) como un biocatalizador para la

conversión mejorada de glucosa y/o sacarosa en ácido láctico.

Conforme a la presente invención, el metabolismo de un microorganismo se puede modificar por introducción y expresión de varios genes.

5 Conforme a la presente invención, varios plásmidos nuevos se pueden introducir en *E. coli* de modo que el microorganismo transformado pueda producir grandes cantidades de ácido láctico en varias condiciones de fermentación.

Las *E. coli* recombinantes de la invención preferiblemente están modificadas de modo que el ácido láctico se produce de forma estable con un rendimiento elevado cuando se cultiva en un medio que comprende glucosa y/o

10 [0022] Huéspedes de *E. coli* que contienen los plásmidos de la presente invención fueron depositados en la Agricultural Research Service Culture Collection (Colección de cultivos del servicio de investigación agrícola de EEUU), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604 E.E.U.U.. Los números de registro y fechas de depósito son los siguientes:

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

15 [0023] Los cultivos en cuestión han sido depositados en condiciones que aseguran que el acceso a los cultivos estará disponible durante el tiempo en que esta solicitud de patente esté pendiente a quien determine el comisario de patentes y marcas registradas que está autorizado a ello según 37 CFR 1.14 (artículo 1.14 del título 37 del código de reglamentos federales de EE.UU. o Code of Federal Regulations) y 35 USC 122 (artículo 122 del título 25 del Código de EE.UU. o US Code).

Los depósitos están disponibles según requieran las leyes de patentes extranjeras en países donde se presenten solicitudes homólogas a la presente solicitud, o derivadas.

20 Sin embargo, se debe entender que la disponibilidad de los depósitos no constituye una licencia para poner en práctica la presente invención en derogación de los derechos de patente concedidos por acción gubernamental.

[0024] Además, los presentes depósitos de cultivos serán almacenados y puestos a disposición del público en conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest para el depósito de microorganismos, es decir, serán almacenados con todas las precauciones necesarias para mantenerlos viables y no contaminados durante un periodo de al menos cinco años después de la solicitud más reciente de suministro de una muestra de los depósitos y, en cualquier caso, durante un periodo de al menos 30 (treinta) años después de la fecha de depósito o durante la vida ejecutable de cualquier patente que pueda incluir la divulgación de los cultivos.

El depositante reconoce el deber de reemplazar los depósitos en caso de que el depósito no poder proporcionar una muestra cuando se solicite, debido al estado de los depósitos.

35 Toda restricción acerca de la disponibilidad al público de los presentes depósitos de cultivos será eliminada irrevocablemente al concederse una patente que los divulgue.

[0025] Una forma de realización de la presente invención proporciona una cepa de *E. coli* B ("SZ132"; N° de depósito: NRRL B-30861) que está modificada genéticamente para mejorar el crecimiento celular y la producción de lactato en varios medios.

En una forma de realización, la cepa SZ132 se puede construir para producir D-lactato (ácido láctico) a través de los pasos siguientes:

45 (a) construir la cepa LY52 de *E. coli* K011 integrando los genes *casAB* de *Klebsiella oxytoca* (n° de depósito ATCC 68564) para la utilización de celobiosa detrás del codón de terminación de *lacY* e integrando la endoglucanasa que codifica el gen *celY* de *Erwinia chrysanthem* (n° de depósito ATCC 55124) en el gen *frdA* (Ohta et al., 1991; Moniruzzaman et al., 1997; Zhou e Ingram, 1999);

(b) transducir secuencialmente en LY52 de determinadas mutaciones en *E. coli* K-12 (cepa W3110), que fueron usadas para la construcción de la cepa SZ63 (Zhou et al., 2003);

50 (c) eliminar los genes de *Z. mobilis* para la producción de etanol mediante transducción con P1 de la supresión de Δ *focA-pflB* de la cepa SZ31 (cepa W3110);

(d) inactivar la producción de alcohol deshidrogenasa de *E. coli* nativa mediante transducción con P1 de la mutación de *adhE* de la cepa TC20 (Zhou et al., 2003);

(e) delecionar la acetato-cinasa (*ackA*) utilizando la mutación de la cepa SZ61 (cepa W3110) (Zhou et al., 2003);

(f) eliminar los genes antibióticos, que fueron usados para la selección, por recombinasa FLP (Zhou et al., 2003);

y

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

[0026] Las formas de realización relacionadas de la invención implican también la transformación de la cepa SZ132 para eliminar todos genes foráneos.

En una forma de realización, los genes *casAB* de *Klebsiella oxytoca* y *celY* de *Erwinia chrysanthemi* fueron eliminados de la cepa SZ132 por recombinación homóloga utilizando ADN lineal; luego, se usó recombinasa FLP para eliminar los genes antibióticos usados durante la construcción de la cepa SZ132.

La cepa resultante, SZ186 (Nº de depósito NRRL B-30862), sólo contiene genes de *E. coli* nativos.

[0027] Otra forma de realización de la presente invención proporciona una cepa de *E. coli* B ("TG103") que está modificada genéticamente para mejorar el crecimiento celular y la producción del isómero L de ácido láctico en varios medios.

En una forma de realización, la cepa TG103 se puede construir mediante los pasos siguientes:

(a) modificar genéticamente la cepa SZ186 utilizando métodos como los descritos en este documento;

(b) someter la cepa SZ186 a un cultivo en serie para seleccionar para un crecimiento aumentado y/o producción de ácido láctico aumentada, donde las cepas seleccionadas son la cepa SZ194;

(c) integrar un gen de ácido L-láctico heterólogo y marcador de canamicina en el gen *ldhA* nativo (D-lactato-deshidrogenasa) de SZ194 y delecionar la parte central de la región de codificación para producir TG101;

(d) eliminar genes antibióticos mediante recombinasa FLP para producir TG102 y

(e) someter la cepa TG102 a transferencia en serie durante varios días (por ejemplo, aproximadamente de 7 a 21 días, preferiblemente hasta 13 días), con una dilución de 1:100 de caldo de cultivo previamente inoculado cada día y seleccionar cepas que demuestren un crecimiento mejorado y/o una producción de ácido L-láctico aumentada, donde las cepas seleccionadas son TG103.

[0028] Según ciertas formas de realización de la presente invención, el crecimiento aumentado y la producción de ácido láctico aumentado están relacionados.

El proceso de coselección para las cepas con un crecimiento y una producción de ácido láctico mejorados se denomina "Evolución Metabólica". Algunas formas de realización determinadas de la invención también proporcionan la inactivación o deleción de ciertos genes en los organismos genéticamente modificados proporcionados por esta solicitud.

En un aspecto de la invención, los genes se delecionan para inactivar la actividad deseada.

Las deleciones proporcionan una estabilidad máxima porque no hay oportunidad de que se produzca una mutación inversa para recuperar la función.

De forma alternativa, los genes se pueden inactivar por inserción de secuencias de ácidos nucleicos que interrumpen la función y/o expresión del gen (por ejemplo, transducción con P1 u otros métodos conocidos en la técnica).

La inactivación o deleción de una o varias secuencias de polinucleótidos particulares como se discute en la presente solicitud también pueden denominarse "modificaciones" genéticas.

[0029] El vector usado para introducir genes específicos en un microorganismo huésped puede ser cualquier vector que pueda replicarse en el microorganismo huésped.

Los vectores de la presente invención pueden ser operables como vectores de clonación o vectores de expresión en la célula huésped seleccionada. Numerosos vectores resultan conocidos a profesionales expertos en la técnica, y la selección de un vector y célula huésped apropiados es cuestión de elección.

Los vectores pueden, por ejemplo, ser bacteriófagos, plásmidos, virus o híbridos de los mismos, tales como los descritos en Maniatis et al., 1989; Ausubel et al., 1995; Miller, J.H., 1992; Sambrook y Russell, 2001.

Además, los vectores de la invención pueden ser vectores de fusión o no.

[0030] Dentro de cada vector específico, se pueden seleccionar varios sitios para la inserción de una secuencia de nucleótidos de interés.

Estos sitios son normalmente designados por la enzima de restricción o endonucleasa que los corta.

El vector se puede digerir con una enzima de restricción que coincide con la secuencia terminal del gen y las secuencias pueden ser ligadas.

El ligamiento se logra normalmente usando una ligasa tal como T4 ADN-ligasa.

[0031] El sitio particular elegido para la inserción del fragmento de nucleótido seleccionado en el vector para formar un vector recombinante se determina por una variedad de factores.

Éstos incluyen el tamaño y la estructura del polipéptido que se va a expresar, la susceptibilidad del polipéptido deseado a la degradación enzimática por los componentes de la célula huésped y la contaminación por sus proteínas, características de expresión como la ubicación de los codones de inicio y los codones de terminación, y

otros factores reconocidos por los expertos en la técnica. Ninguno de estos factores por sí mismo controla absolutamente la elección del sitio de inserción para un polipéptido concreto.

Más bien, el sitio elegido refleja un equilibrio de estos factores, y no todos los sitios pueden ser igualmente eficaces para una proteína dada.

5 [0032] Se pueden emplear una variedad de sistemas de expresión vector-huésped al poner en práctica la presente invención.

Las cepas de bacterias, tales como *E. coli*, son particularmente útiles para la producción de ácido láctico en la práctica de la invención.

10 Sin embargo, la invención nueva aquí descrita se puede aplicar con numerosos huéspedes que serían deseables para varios esquemas de producción de ácido láctico.

Las cepas huéspedes pueden ser de origen bacteriano, fúngico o levaduras.

Los factores que se pueden tener en cuenta al seleccionar las cepas huésped incluyen el rango de sustratos, vigor, tolerancia al azúcar, tolerancia a la sal, tolerancia de temperatura, tolerancia de pH, y tolerancia al lactato.

15 Constatar el sistema de huésped-vector más apropiado es tá dentro de los conocimientos del experto en la técnica.

[0033] Previamente se han descrito métodos para las delecciones cromosómicas, integración, y genes de resistencia a antibióticos desmontables (Causey et al., 2004; Datsenko y Wanner, 2000; Martinez-Morales et al., 1999; Zhou et al., 2003).

20 Cualquier método o combinación de tales métodos conocidos se puede emplear al poner en práctica la presente invención.

[0034] Como promotor para la expresión del/de los gen(es) que se van a presentar en el microorganismo huésped (por ejemplo, genes *casAB* de *K. oxytoca* o *celY* de *E. chrysanthemi*), cuando un promotor específico para el gen funciona en células huésped, este promotor se puede usar.

25 Alternativamente, también es posible enlazar un promotor foráneo a un ADN que codifica el gen para obtener la expresión bajo el control del promotor.

Como tal promotor, cuando una bacteria de *Escherichia* se usa como huésped, promotor *lac*, promotor *trp*, promotor *trc*, promotor *tac*, promotor P_R y promotor P_L de fago lambda, promotor *tet*, promotor *amyE*, promotor *spac*, etc pueden ser usados.

30 Además, también es posible a usar un vector de expresión que contiene un promotor como pUC19, e insertar un fragmento de ADN, que codifica por ejemplo *casAB* de *K. oxytoca*, en el vector de modo que el fragmento se puede expresar bajo el control del promotor.

35 [0035] Métodos para la preparación de ADN cromosómico, PCR, la preparación de ADN plasmídico, la digestión y ligamiento de ADN, la transformación, el diseño y la síntesis de oligonucleótidos usados como cebadores, etc pueden ser habituales y bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos son descritos en, por ejemplo, Seambrook, J. et al. (1989), etcétera.

40 [0036] El ácido láctico se puede producir permitiendo que un microorganismo transformado, como se ha descrito anteriormente, convierta glucosa y/o sacarosa en ácido láctico, y recogiendo el ácido láctico producido.

En un aspecto de la invención, se puede producir ácido láctico a niveles superiores a 0,5M cuando se cultivan organismos transformados en uno o más medios de sales minerales, tales como un medio de sales minerales NBS.

45 [0037] Los vectores de la invención se pueden replicar autónomamente o integrar en el genoma del huésped.

La integración ocurre típicamente por recombinación homóloga (por ejemplo, integración de un marcador seleccionable de arginina en el gen de arginina cromosómico) o en un sitio cromosómico no relacionado con ningún gen del vector.

La integración puede ocurrir por un evento o bien único o bien doble de cruce.

50 También es posible que cualquier número de estos tipos de integración y de replicación ocurran en el mismo microorganismo construido.

[0038] En determinadas formas de realización, el cultivo de los microorganismos modificados genéticamente de la invención se realiza en condiciones aeróbicas a lo largo de aproximadamente 0,5 a 240 horas.

55 La temperatura de cultivo está preferiblemente controlada en alrededor de 25°C a 45°C, y el pH está preferiblemente controlado a 5-8 durante el cultivo.

El ácido inorgánico u orgánico, o sustancias alcalinas así como gas de amoníaco o similares se pueden usar para el ajuste del pH.

60 [0039] El microorganismo de la presente invención puede ser obtenido por transformación de una bacteria de *Escherichia* para expresar ciertas enzimas útiles en la producción de ácido láctico.

En una forma de realización preferida, una bacteria de *Escherichia* que se puede usar en la presente invención es *Escherichia coli*.

65 Otras divulgaciones incluyen, pero de forma no limitativa, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter*

5 *paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperdae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilum*,
 10 *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*, *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantium*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium meningosepticum*, la especie de *Micrococcus* CCM825,
 15 *Morganella morgani*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovolans*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, la especie de *Rhodococcus* ATCC 15592, la especie de *Rhodococcus* ATCC 19070, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*,
 20 *Vibrio tyrogenes*, *Actinomadura madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flavelus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmulleri*, *Xanthomonas citri*, etcétera.

[0040] El ácido láctico se puede producir en una mezcla de reacción al ponerse en contacto con un cultivo que contiene microorganismos transformados preparados conforme a la presente invención con sacarosa y/o glucosa.
 25 En otras formas de realización de la invención, las células se separan y se recogen de un cultivo de microorganismos transformados; células de microorganismos transformados procesadas sometidas a un tratamiento de acetona o liofilización; un extracto libre de células preparado de tales células de microorganismos transformados o células procesadas; fracciones tales como fracciones de membrana divididas de tal extracto libre de células; o materiales inmovilizados se pueden producir inmovilizando células de microorganismos transformados, células procesadas, extracto y fracciones libres de células, cualquiera de ellos puesto en contacto de forma independiente o
 30 en combinación con sacarosa y/o glucosa para producir ácido láctico.
 El microorganismo puede consistir en un tipo de microorganismo, o se puede usar como una mezcla arbitraria de dos o más tipos de microorganismos.

[0041] Los parámetros de fermentación son dependientes del tipo de organismo huésped usado para la producción de la enzima recombinante.
 35 El medio de cultivo puede ser mínimo/definido o completo/complejo.
 Las fuentes de carbono fermentables podrían incluir azúcares de hexosa y pentosa, almidón, celulosa, xilano, oligosacáridos, y combinaciones de los mismos.
 Una forma de medios de cultivo que se pueden usar conforme a la presente invención incluye caldo de Luria-Bertani (LB) modificado (con 10 g de triptona Difco, 5 g de extracto de levadura Difco, y 5 g de cloruro sódico por litro) como lo describe Miller J.H. (1992).
 40 En otras formas de realización de la invención, los cultivos de cepas construidos de la invención se pueden cultivar en un medio de sales minerales NBS (como descrito por Causey et al., 2004) y suplementado con 2% a 20% (p/v) de azúcar o bien 5% o 10% de azúcar (glucosa o sacarosa).
 45 Los microorganismos se pueden cultivar en o sobre un medio de sales minerales NBS.
 El medio de sales minerales NBS comprende, consiste esencialmente en, o consiste en los componentes siguientes (por litro): 3,5 g de KH_2PO_4 ; 5,0 g de K_2HPO_4 ; 3,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 15 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 mg de tiamina; y 1 ml de caldo de metales traza, glucosa (por ejemplo, 2% en placas o 3% en el caldo), y 1,5% de agar (para placas).
 50 El caldo de metales traza se prepara en 0,1 M de HCl y comprende, consiste esencialmente en o consiste en (por litro): 1,6 g de FeCl_3 ; 0,2 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de CuCl_2 ; 0,2 g de $\text{ZnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de NaMoO_4 ; 0,05 g de H_3BO_3 . Se puede añadir ácido 4-Morfolinopropanesulfónico (0,1 M, pH 7,1) tanto a medios líquidos como a sólidos (esterilizados por filtro) cuando se necesite para el control del pH (y está opcionalmente incluido en el medio usado para fermentaciones de 10 litros).
 55 El medio mínimo también puede ser preparado usando succinato ($1 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$) como única fuente de carbono (sustrato no fermentable) y se puede añadir como un suplemento al medio mínimo de glucosa cuando se necesite.
 En determinadas formas de realización, se pueden incluir antibióticos como se necesite para la construcción de la cepa.

[0042] El crecimiento y la producción del lactato se pueden realizar en fermentaciones por lotes normales, fermentaciones por lotes alimentados o fermentaciones continuas.
 60 En determinadas formas de realización, es deseable realizar fermentaciones en condiciones de oxígeno reducido o condiciones anaeróbicas para ciertos huéspedes.
 En otras formas de realización, la producción de lactato se puede realizar con oxígeno; y, opcionalmente con el uso de fermentadores de levantamiento por aire o equivalentes.
 65

[0043] El pH de la fermentación debería ser lo suficientemente alto suficiente para permitir el cultivo y la producción de lactato por el huésped.

El ajuste del pH del caldo de fermentación se puede realizar utilizando agentes de neutralizado tales como carbonato cálcico o hidróxidos.

5 Alternativamente, el ácido láctico se puede eliminar continuamente durante la fermentación utilizando métodos tales como la tecnología de membrana, la electrodiálisis, extracción con solvente, y las resinas absorbentes.

La selección e incorporación de cualquiera de los métodos fermentativos anteriores depende en gran medida de la cepa huésped y del proceso terminal preferido.

10 [0044] Varias divulgaciones incluyen:

1. Una cepa de *E. coli* genéticamente modificada que comprende las siguientes modificaciones genéticas a la cepa KO11 de *E. coli* (ATCC 55124): a) inserción del gen *casAB* de *Klebsiella oxytoca* detrás del codón de terminación de *lacY*; b) integración del gen *celY* de *Erwinia chrysanthemi* en el gen *frdA*; c) inactivación o delección de *focA-Z. Mobilis pdc-adhB-pflB*; d) inactivación o delección del gen de alcohol deshidrogenasa de *E. coli* nativo; y e) inactivación o delección del gen de acetato-cinasa (*ackA*);
2. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 1, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada comprende además genes de resistencia a antibióticos inactivados o delecionados;
3. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 1, donde el gen *casAB* de *Klebsiella oxytoca* y el gen *celY* de *Erwinia chrysanthemi* son inactivados o delecionados en dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada después de la inserción;
4. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 2, donde el gen *casAB* de *Klebsiella oxytoca* y el gen *celY* de *Erwinia chrysanthemi* son inactivados o eliminados en dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada después de la inserción;
5. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 2, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es metabólicamente desarrollada;
6. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 1 o la forma de realización 3, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es metabólicamente desarrollada;
7. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 4, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es metabólicamente desarrollada;
8. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según las formas de realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7, donde los genes antibióticos se eliminan con recombinasa FLP;
9. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 7, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es SZ186;
10. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 5, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es SZ132;
11. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 1, 2, 3, 4 o 5, donde el gen *mgsA* de dicha cepa es inactivado o delecionado en dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada;
12. Una cepa de *E. coli* genéticamente modificada que comprende la cepa de *E. coli* SZ194 (NRRL B30863) donde el gen *mgsA* ha sido inactivado o delecionado;
13. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 12, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es metabólicamente desarrollada;
14. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 13, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada es TG112, TG113 o TG114;
15. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 11 o 12, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada comprende además un gen de *ldhA* nativo inactivado o eliminado y un gen insertado recombinantemente que codifica heterólogo de recombinación de deshidrogenasa de L-lactato;
16. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 15, donde dicho gen de deshidrogenasa de L-lactato heterólogo es un gen *ldhL* (por ejemplo, un gen *ldhL* obtenido de *P. acidilactici*);
17. La cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la forma de realización 15 o la forma de realización 16, donde dicha cepa es metabólicamente desarrollada;
18. Una cepa de *E. coli* genéticamente modificada seleccionada de TG112, TG113 o TG114, SZ194, SZ132, SZ186, o TG103;
19. Un método de cultivo o desarrollo de una cepa de *E. coli* genéticamente modificada que comprende inocular un medio de cultivo con una o varias cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquier forma de realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 y cultivar o desarrollar dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada;
20. Un método para producir D-(-)-lactato o ácido D-(-)-láctico que comprende cultivar una o varias cepas de *E. coli* genéticamente modificadas según cualquiera de formas de realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 en condiciones que permiten la producción de ácido D-(-)-láctico y opcionalmente neutralizar el ácido D-(-)-láctico para formar D-(-)-lactato;
21. El método según la forma de realización 20, donde dicha(s) una o varias cepas de *E. coli* genéticamente modificadas es/son seleccionada(s) de TG 112, TG 113, TG114 o SZ 194;
22. Un método para producir L-(+)-lactato o L-(+)-ácido láctico que comprende cultivar una o varias cepas de *E. coli* genéticamente modificada(s) según cualquiera de las formas de realización 15, 16 o 17 bajo condiciones que permiten la producción de L-(+)-ácido láctico y opcionalmente neutralizar el L-(+)-ácido láctico para formar L-(+)-

lactato;

23. El método según la forma de realización 22, donde dicha(s) una o varias cepas de *E. coli* genéticamente modificadas es TG103, TG105, TG106, TG107, o TG108;

24. El método según cualquiera de las formas de realización 19, 20, 21, 22, o 23, donde dicha cepa de *E. coli* genéticamente modificada se cultiva en un medio de sales minerales;

25. El método según la forma de realización 24, donde el medio de sales minerales comprende entre 2% y 20% (p/v) de un azúcar;

26. El método según la forma de realización 25, donde el medio de sales minerales contiene 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 18%, 18.5%, 19%, 19.5% o 20% (p/v) de un azúcar;

27. El método según la forma de realización 25 o 26, donde el azúcar es glucosa o sacarosa o una combinación de glucosa y sacarosa;

28. El método según la forma de realización 20, donde una cepa de *E. coli* genéticamente modificada como se expone en la forma de realización 11 se cultiva bajo condiciones que permiten la producción de D(-)-lactato o ácido D(-)-láctico quiralmente puro;

29. El método según la forma de realización 22, donde una cepa de *E. coli* genéticamente modificada como se expone en la forma de realización 15, 16 o 17 se cultiva bajo condiciones que permiten la producción de L-(+)-lactato o L-(+)-ácido láctico quiralmente puro;

30. El método según la forma de realización 21, donde dicho método produce D(-)-lactato o ácido D(-)-láctico quiralmente puro;

31. El método según la forma de realización 23, donde dicho método produce L-(+)-lactato o L-(+)-ácido láctico quiralmente puro;

32. El método según la forma de realización 28, 29, 30 o 31, que comprende además la etapa de purificación del lactato quiralmente puro (L-(+)-lactato o D(-)-lactato);

33. El método según cualquier forma de realización 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32, donde el lactato (por ejemplo, el L-(+)-lactato o D(-)-lactato) se produce a concentraciones de al menos 0,5M

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

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

36. El método según la forma de realización 36, donde el rendimiento es al menos 90%, 90.5%, 91%, 91.5%, 92%, 92.5%, 93%, 93.5%, 94%, 94.5%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, o 99%;

37. El método según forma de realización 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36, donde no hay contaminación detectable de una forma estereoisomérica de ácido láctico o lactato con la otra forma estereoisomérica (por ejemplo, la pureza quiral del estereoisómero específico es al menos, mayor de (o mayor de o igual a) 99.9%); o

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

[0045] A continuación aparecen ejemplos que ilustran procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no deberían ser interpretado como limitativos.

Todos los porcentajes son en peso y todas proporciones de mezcla de solvente son en volumen a menos que se especifique de otro modo.

Ejemplo 1

Preparación y análisis de las cepas de *e. Coli* sz132 y sz186

[0046] Las cepas de *E. coli* usadas en este ejemplo se enumeran en la Tabla 1.

La cepa SZ63 es un derivado de *E. coli* K-12 (ATCC 27325).

KO11 (ATCC 55124) es un derivado de *E. coli* B (ATCC 11303) que contiene los genes de producción de etanol de *Zymomonas mobilis* integrados en el gen *pflB*.

Tabla 1. Cepas de *E. coli*

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

SZ132	LY52, $\Delta(\text{focA-pdc-adhB-pflB}) \Delta\text{adhE}::\text{FRT} \Delta\text{ackA}::\text{FRT}, \Delta\text{casA}$	Este ejemplo
SZ186	SZ132, $\Delta K. oxytoca \text{casAB} \Delta E. chrysanthemi \text{celY}$	Este ejemplo

[0047] Se cultivaron cultivos a 37°C en caldo modificado Luria-Bertani (LB) (por litro: 10 g de triptona de Difco, 5 g de extracto de levadura de Difco, 5 g de cloruro sódico) o en el medio de sales minerales NBS suplementado con 5% o 10% de azúcar (glucosa o sacarosa).

5 [0048] Se usaron métodos estándar para la construcción plasmídica. Los métodos para las deleciones cromosómicas, integración, y genes de resistencia a antibióticos desmontables han sido previamente descritos.

10 Las cepas de *E. coli* DH5 α y S17-1 fueron usadas como huéspedes para la construcción plasmídica. La cepa NC3 fue usada como huésped intermedio para minimizar los problemas asociados a las enzimas de restricción durante transducción con P1 de cepas K-12 a cepas B (Dien et al., 2001).

15 [0049] Se prepararon cultivos de siembra como se describió previamente en Shukla et al. (2004) y Zhou et al., (2003) y se usaron para inocular cubas de fermentación pequeñas (350 ml de volumen de trabajo, 35°C, 150 r.p.m. de agitación).

20 El caldo fue mantenido a pH 7,0 mediante la adición automática de 6 N de hidróxido de potasio. Los datos representados en gráfico representan un promedio de 2 o más réplicas. Las barras que notan el error típico del medio se incluyen para promedios de 3 o más fermentaciones. La productividad volumétrica máxima para el lactato se estimó a partir de la región más inclinada de cada gráfico. Ninguno de los antibióticos fueron incluidos durante el cultivo de cultivos de siembra o en los caldos de fermentación.

[0050] La masa celular fue estimada por medición de densidad óptica a 550 nm (330 mg de peso/l de célula en seco a 1,0 OD_{550nm}).

25 La producción de ácido orgánico total (principalmente de lactato) fue medida por consumo de base (hidróxido de potasio).

Los productos ácidos fueron analizados al final de la fermentación por cromatografía en fase líquida de alta eficacia. El etanol fue medido por cromatografía de gases.

30 Construcción de la cepa SZ132

[0051] La cepa LY52 fue construida a partir de KO11 integrando los genes *casAB* de *Klebsiella oxytoca* (Moniruzzaman et al. 1997) para la utilización de celobiosa detrás del codón de terminación de *lacY* e integrando el gen *celY* que codifica la endoglucanasa de *Erwinia chrysanthemi* (Zhou e Ingram, 1999) en el gen *frdA*.

35 Las mutaciones previamente caracterizadas en *E. coli* K-12 (cepa W3110) usadas para construcción de SZ63 (Zhou et al., 2003) para la producción de lactato fueron consecutivamente transducidas en LY52.

Los genes de *Z. mobilis* para la producción de etanol fueron eliminados por transducción con P1 de la deleción de $\Delta\text{focA-pflB}$ de SZ31.

La alcohol deshidrogenasa de *E. coli* nativa fue inactivada por transducción con P1 de la mutación *adhE* de TC20.

40 La acetato-cinasa (*ackA*) fue eliminada utilizando la mutación en SZ61.

Los genes antibióticos usados para la selección fueron eliminados por recombinasa FLP (Zhou et al., 2003).

Durante la eliminación de los genes antibióticos con recombinasa FLP, un segmento interno de *casAB* fue también eliminado.

45 El análisis de secuencias de *casAB* y promotores reveló la presencia de regiones del ADN muy similares al sitio de reconocimiento para la recombinasa FLP y se presume que son responsables de esta deleción.

[0052] La cepa resultante fue aclimatada a medios mínimos mediante subcultivo secuencial con un inóculo de 1%.

Tanto el cultivo celular como la producción de lactato mejoraron durante estas transferencias.

El caldo de la transferencia última fue estriado en medio sólido para el aislamiento de clones.

50 Se seleccionó uno y se designó SZ132.

Construcción de la cepa SZ186

[0053] Se construyó otro derivado de SZ132 del que se eliminaron todos los genes formáneos.

55 Los genes *casAB* de *K. oxytoca* y *celY* de *E. chrysanthemi* fueron eliminados por recombinación homóloga usando ADN lineal.

Se usó recombinasa FLP para eliminar los genes antibióticos usados durante las construcciones.

La cepa resultante, SZ186, contiene sólo genes de *E. coli* nativos.

60 Análisis de la producción de ácido láctico

[0054] Se construyeron mutaciones genéticas análogas en derivados de *E. coli* K-12 y *E. coli* B para producir SZ63 (Zhou et al., 2003) y SZ132, respectivamente.

SZ132 fue superior a SZ63 en cuanto al cultivo celular y la producción de lactato (isómero D) (ver figura 1A).

En el medio rico, SZ132 completó la fermentación de 10% de glucosa en 48 h para producir más de 1 mol de lactato/1 de caldo de fermentación, dos veces más que lo señalado previamente para cepas basadas en *E. coli* K-12.

5 Las fermentaciones con SZ63 y 10% de glucosa se estancaron después de 72 h y produjeron sólo 840 mmoles de lactato/1 de caldo después 120 h. en medios ricos, la producción de lactato fue más alta para SZ132 (95%) que para la cepa de K-12 SZ63 (88%).

La productividad volumétrica máxima para SZ132 fue de 75 mmoles/1 h, 76% superior a la de SZ63 (tabla 2).

Tabla 2. Resumen de fermentaciones de ácido láctico							
Cepas de <i>E. coli</i>	Sustrato	Ácido láctico producido			Co-productos producidos (mM)		
		Concentración (mM)	Concentración ajustada de base (mM)	Rendimiento (%)	Succinato	Acetato	Etanol
SZ132	NBS 10%Glu	556.01 ± 0.54	614.09 ± 0.54	91	32.11 ± 1.49	13.95 ± 0.57	≤ 1
SZ132	NBS 10%Glu + Betaína	792.23 ± 8.67	930.30 ± 8.67	86	78.92 ± 2.45	11.56 ± 0.75	≤ 1
SZ132	NBS 10%Suc	556.88 ± 33.21	609.78 ± 33.21	92	2.79 ± 0.02	≤ 1	≤ 1
SZ132	NBS 10%Suc + Betaína	889.06 ± 157.53	1045.95 ± 157.53	88	38.00 ± 7.33	12.24 ± 3.72	≤ 1
SZ186	NBS 10%Glu	600.41 ± 2.67	670.31 ± 2.94	99	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ186	NBS 10%Glu + Betaína	658.75 ± 21.37	744.39 ± 24.15	98	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ186	NBS 10%Suc	573.27 ± 21.98	635.76 ± 24.38	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ186	NBS 10%Glu + Betaína	638.41 ± 33.59	718.06 ± 38.19	96	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194 (Nº depósito. NRRL B- 30863)	NBS 10%Glu + Betaína	717.60 + 51.51	823.85 + 65.48	96	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	LB pH6.5 10%Glu + Betaína	607.52 + 6.17	676.77 + 6.87	92	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	LB pH7.0 10%Glu + Betaína	714.06 + 7.38	813.35 + 9.61	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	LB pH7.5 10%Glu + Betaína	913.16 + 25.73	1070.19 + 27.57	97	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	LB pH8.0 10%Glu + Betaína	903.22 + 21.51	1060.38 + 25.26	96	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	NBS pH7.5 10%glu + betaína	864.31 + 4.93	1019.89 + 5.81	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	NBS pH7.5 12%glu + betaína	1012.18 + 27.41	1227.60 + 31.16	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	NBS pH7.5 14%glu + betaína	1001.08 + 9.48	1217.02 + 13.51	95	≤ 1	≤ 1	≤ 1
SZ194	NBS pH7.5 6+3+3%glu + betaína	1003.65 + 12.74	1216.45 + 16.48	93	≤ 1	≤ 1	≤ 1

[0055] En un medio de sales minerales NBS que contenía 5% de glucosa, el rendimiento celular y la productividad volumétrica para SZ132 fueron dos veces mayores que los de SZ63 (ver figura 1B).

La cepa SZ132 completó la fermentación de 5% de glucosa en 36 h, menos de 1/4 del tiempo requerido para la SZ63.

5 Bajo estas condiciones, el rendimiento celular y la productividad volumétrica para las fermentaciones con sales minerales NBS fueron sólo de un 25-35% de aquellas con medio rico y 10% de glucosa.

[0056] Ni la cepa SZ132 ni la SZ63 completaron la fermentación de 10% de glucosa en el medio de sales minerales NBS en 144 h (ver figura 1C).

10 La producción de lactato para ambas cepas fue de más de 90% basada en azúcar metabolizado.

Con un medio de sales minerales NBS que contenía un 10% de glucosa, el rendimiento celular (0,83 g/l), la producción de lactato (700 mmoles/l de caldo de fermentación), y la productividad volumétrica (11,2 mmoles de lactato/1 h) para SZ132 fueron aproximadamente dos veces superiores a las de SZ63.

15 Con un medio de sales minerales NBS y un 10% de glucosa, productividad volumétrica para SZ132 fue de menos del 20% de la observada en el medio rico.

[0057] La sacarosa fue fermentada más lentamente que la glucosa en el medio rico y en el medio de sales minerales NBS.

20 Estudios precedentes han demostrado que SZ63 (pLOI3501) requirió 36 h para completar la fermentación de 5% de sacarosa en el medio rico pero fue incapaz de completar la fermentación de 10% de sacarosa en este medio.

SZ132 completó la fermentación de 10% de sacarosa en el medio rico en 120 h y produjo más de 1 mol lactato/l de caldo de fermentación (ver figura 1D), casi dos veces más de lo que se había observado previamente para SZ63 que contenía el plásmido de sacarosa.

25 [0058] La productividad volumétrica para SZ132 en el medio de sales minerales NBS con 10% de sacarosa (9,3 mmoles/1 h) fue 1/3 de la observada en el medio rico con sacarosa, menos de 1/8 de la observada en el medio rico con 10% de glucosa (tabla 2).

Aunque un 5% de sacarosa fue fermentado totalmente en el medio de sales minerales NBS en 72 h (ver figura 1E), el 10% de sacarosa no se metabolizó completamente en este medio ni siquiera con tiempos de incubación extendidos.

30 Basándose en el azúcar metabolizado, las producciones de sacarosa oscilaron entre 86% y 93% en ambos medios.

[0059] Estos resultados demuestran que se pueden producir niveles altos de ácidos orgánicos a partir de glucosa y/o sacarosa mediante cepas modificadas de *E. coli* B. La productividad volumétrica máxima fue estimada en 75 mmoles lactato/1 h en el medio rico (LB), más de 3 veces superior a con el medio de sales minerales NBS.

35 Quedan muchas oportunidades de mejora. Los tiempos de incubación requeridos para completar el metabolismo de 10% de sacarosa fueron tres veces más largos que para 10% de glucosa en el medio complejo, y más largos todavía en el medio de sales minerales.

La reducción de los tiempos de fermentación sin la adición costosa de nutrientes complejos puede ser esencial.

40 La identificación de los constituyentes que aumentan el crecimiento y la productividad podrían reducir sustancialmente los costes asociados a la fermentación y también ofrecer una oportunidad de reducir los gastos asociados a la purificación del lactato y al tratamiento de desechos.

[0060] Las figuras 2-5 ilustran el progreso en la producción de ácido láctico (isómero D) mediante varias formas de realización, es decir SZ132, SZ186, y SZ194 (Nº de depósito NRRL B-30863) de la invención bajo varias condiciones de fermentación en el medio de sales minerales NBS.

45 Ejemplo 2

50 Preparación de la cepa de *E. Coli* sz194

[0061] Las cepas y plásmidos usados en la preparación de la cepa SZ194 se enumeran en la tabla 3. Los cultivos fueron desarrollados a 37°C en caldo de Luria modificado (por litro: 10 g de triptona de Difco, 5 g de extracto de levadura de Difco, 5 g de cloruro sódico) (Miller, J.H. 1992 A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) o en un medio de sales minerales NBS (Causey, T.B. et al. 2004, "Engineering Escherichia coli for efficient conversion of glucosa to pyruvate," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2235-2240) suplementado con 1 mM de betaína y 2% -14% de (p/v) de azúcar (glucosa o sacarosa).

Tabla 3. Cepas y plásmidos de <i>E. coli</i>		
Cepas	Características pertinentes	Fuentes
SZ132	$\Delta(\text{focA-Z. mobilis pdc-adhB-pflB}) \text{ adhE}::\text{FRT } \Delta\text{ack}::\text{FRT } \Delta\text{frd, frdA}::\text{E. chrysanthemi celY lacY}::\text{K. oxytoca casAB}$	Zhou et al. (2005)
SZ136	SZ132, seleccionado para crecimiento y fermentación rápidos en 10% de sucrosa	Este ejemplo
SZ162	SZ136, $\Delta\text{frdBC}::\text{FRT } \Delta \text{ adhE}::\text{FRT}$	Este ejemplo

SZ186	SZ162, $\Delta casAB::FRT \Delta celY::FRT$	Este ejemplo
SZ186	SZ186, seleccionado para crecimiento y fermentación rápidos en 10% de sucrosa	Este ejemplo
Cepas	Características pertinentes	Fuentes
pKD46	<i>Bla</i> y β <i>exo</i> (Recombinasa roja), replicón pSC101 dependiente de la temperatura	Datsenko and Wanner (2000)
pFT-A	<i>Bla flp</i>), replicón pSC101 dependiente de la temperatura	Posfai <i>et al.</i> (1997)
pLOI2511	<i>colE1</i> , FRT- <i>kan</i> -FRT, <i>bla</i>	
pLOI3924	<i>colE1</i> , <i>bla kan lacY'</i> -FRT- <i>Kan</i> -FRT- <i>lacYA</i>	

[0062] Se usaron métodos estándar para la amplificación de ADN, la digestión enzimática, la purificación y la construcción plasmídica (Miller *et al.*, 1992; Sambrook y Russell, 2001).

Previamente se han descrito métodos para la delección e integración de genes cromosómicos (Causey *et al.*, 2004; Datsenko and Wanner, 2000; Martinez-Morales *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2003a).

[0063] pLOI3924 plasmídico fue construido para facilitar la delección de los genes *casAB* mediante la clonación de genes *lacY* y *lacA* que usan "ORFmers" (Sigma-Genosis, The Woodlands, TX), y la inserción del cassette FRT-*kan*-FRT (digestión *Sma*I) de pLOI2511 entre el sitio *Nde*I en el carboxiterminal de *lacY* y el N-terminal ATG de *lacA*.

El fragmento amplificado (ORFmer directo para *lacY*; ORFmer inverso para *lacA*) de este plásmido fue usado para la integración cromosómica y la delección de los genes *casAB*.

Los cebadores híbridos usados para las delecciones de gen adicionales y la secuencia contenida correspondientes a aproximadamente 45 pares de bases del principio o del extremo del gen objetivo más 20 par de bases de secuencia de ADN correspondientes al cassette de canamicina flanqueada por FRT son descritos en la tabla 4.

Cebador	SEC ID Nº:	Secuencia
Cebador sentido para delección de <i>frdBC</i>	1	ATGGCTGAGATGAAAAACCTGAAAAT TGAGGTGGTGCCTATAACGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
Cebador antisentido para delección de <i>frdBC</i>	2	TTACCAGTACAGGGCAACAAACAGGA TTACGATGGTGGCAACCACCATATGAA TATCCTCCTTAG
Cebador sentido para delección de <i>adhE</i>	3	ATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACTT AACGCACTCGTAGAGCGTGTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
Cebador antisentido para delección de <i>adhE</i>	4	TTAAGCGGATTTTTTCGCTTTTTTCTCA GCTTTAGCCGGAGCAGCCATATGAATA TCCTCCTTAG
Cebador sentido para delección de <i>celY</i>	5	GATAAGGCGGAAGCAGCCAATAAGAA GGAGAAGGCGAATGGCTGAGTGTAGG CTGGAGCTGCTTC
Cebador antisentido para delección de <i>celY</i>	6	CCAGAATACCGGTTTCGTCAGAACGCTT TGGATTTGGATTAATCATCATATGAAT ATCCTCCTTAG

[0064] A menos que se especifique lo contrario, se usó un medio de sales minerales NBS (Causey *et al.*, 2004) que contenía 1 mM de betaína y 10% de azúcar (glucosa o sacarosa) en todas las fermentaciones (pH 7.0).

Se prepararon cultivos de siembra como se describe previamente (Zhou *et al.*, 2003) y se usaron para inocular cubas de fermentación de 500 ml (350 ml de volumen de trabajo, 35°C, 150 r.p.m. de agitación) a una densidad inicial de 33 mg de peso seco celular (cdw) 1^{-1} .

Donde se indica, también se añadió betaína (1 mM).

El PH del caldo fue mantenido por adición automática de 6 N de hidróxido de potasio.

Un total de un 12% (p/v) de glucosa fue usado en las fermentaciones de flujo continuo (6% + 3% + 3%) de la siguiente manera: 308 ml de medio NBS con 21 gramos de glucosa.

Después de 24 h y 48 h, 21 ml de 50% de glucosa fueron lentamente adicionados en cada vaso.

[0065] Células de fermentaciones controladas por pH fueron transferidas en serie en diferentes periodos (24 o 48 h) para facilitar la evolución metabólica a través de la selección basada en el crecimiento.

Los cultivos consecutivamente transferidos fueron inoculados a una densidad inicial de 33 mg de cdw 1^{-1} .

Los clones aislados al final de las selecciones fueron asignados nuevas designaciones de cepa.

[0066] La masa celular fue estimada mediante medición de la densidad óptica a 550 nm utilizando un espectrofotómetro Spectronic 70 de Bausch & Lomb.

5 La producción total de ácido orgánico (principalmente lactato) fue estimada por consumo de base (hidróxido de potasio) para el mantenimiento del pH.

Los productos ácidos y la pureza quiral fueron analizados al final de la fermentación por cromatografía en fase líquida de alta eficacia (Zhou et al., 2003a).

Los datos mostrados en forma de gráfico representan un promedio de 2 o más réplicas.

10 Las barras que notan la desviación típica se incluyen para promedios de 3 o más fermentaciones.

Análisis de la producción de ácido láctico

15 [0067] La betaína, un osmolito de protección, fue altamente beneficiosa para el cultivo celular y la producción de lactato por SZ132 en un medio de sales minerales que contenía altas concentraciones de azúcar, supuestamente debido a la segmentación de carbono insuficiente en la biosíntesis de osmolitos nativos tales como glutamato y trehalosa (Purvis et al., 2005).

Las transferencias en serie de SZ132 fueron llevadas a cabo en el medio de sales minerales con 10% de sacarosa para seleccionar cepas con un rendimiento equivalente en ausencia de betaína (Figuras 6A y 6B).

20 La producción de energía para el cultivo en la cepa SZ32 depende de flujo glicolítico con lactato como la vía dominante para la oxidación de NADH, proporcionando una selección basada en el crecimiento.

El cultivo y la producción de ácido (consumo de base) mejoró de forma constante durante las transferencias en serie. En las transferencias finales, sacarosa al 10% fue fermentada por completo sin betaína adicionada.

Un clon fue aislado de este cultivo y fue designado cepa SZ136.

25 Esta cepa produjo dos veces el rendimiento celular de la progenitora, SZ132, y títulos 3 veces más altos de lactato después de 96 h (figura 6).

Sin embargo, SZ136 también produjo niveles más altos de succinato y etanol que SZ132 (tabla 5), reduciendo la producción de lactato (basada en azúcar metabolizado).

Tabla 5. Productos de fermentaciones de glucosa

Cepa	Condiciones ^a	Lactato		Co-productos (mmol l ⁻¹)		
		mmol l ⁻¹	Rendimiento (%) ^b	Succinato	Acetato	Etanol
SZ132	NBS + betaína	930 ± 9	86	79 ± 2	12 ± 1	< 1
SZ136	NBS	739	67	126	8	115
SZ162	NBS	660 ± 27	96	< 1	< 1	< 1
SZ186	NBS	670 ± 3	99	< 1	< 1	< 1
SZ186	NBS + betaína	744 ± 24	98	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS + betaína	824 ± 65	96	< 1	< 1	< 1
SZ194	Caldo de Luria pH 6.5	677 ± 7	92	< 1	< 1	1
SZ194	Caldo de Luria pH 7.0	813 ± 10	95	< 1	< 1	< 1
SZ194	Caldo de Luria pH 7.5	1070 ± 28	97	< 1	< 1	< 1
SZ194	Caldo de Luria pH 8.0	1060 ± 25	96	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS, pH 7.5 + betaína	1020 ± 6	95	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS pH7.5 12% glucosa + betaína	1228 ± 31	95	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS, pH 7.5 14% glucosa + betaína	1217 ± 14	95	< 1	< 1	< 1
SZ194	NBS, pH7.5 glucosa (6+3+3%) + betaína	1216 ± 17	93	< 1	< 1	< 1

^a medio de sales minerales NBS con 10% de glucosa (pH 7.0) a menos que se especifique lo contrario. Donde se indique, también se añadió 1 mM de betaína.

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

30 [0068] Las mejoras en el crecimiento de SZ132 en 10% (p/v) de sacarosa parecen haber ido acompañadas por mutaciones que mejoraron el crecimiento pero que también restauraron parcialmente la función de genes mutados para las vías de co-producto.

35 La mutación de fumarato reductasa en la cepa SZ132 está mal caracterizado y fue originalmente obtenida como una delección de Tn5 (Ohta et al., 1991), seguida de una inserción de *ce/Y* entre *frdA* y *frdB* (Zhou et al., 2005).

El gen de alcohol deshidrogenasa fue interrumpido por inserción de un marcador antibiótico con sitios de FRT flanqueantes.

Luego se usó flipasa para eliminar el gen antibiótico dejando solo una región FRT.

40 La posterior delección de regiones de codificación para *frdBC* y *adhE* para producir SZ162 eliminó ambos co-productos pero también redujo el crecimiento y el título final del lactato debido a la utilización de azúcar incompleta (tabla 5).

También se hicieron delecciones adicionales en esta cepa para eliminar los genes foráneos que habían sido previamente integrados para la utilización de celulosa (Zhou et al., 2005): *casAB* (gen transportador de celobiosa) de *Klebsiella oxytoca* y (endoglucanasa) *celY* de *Erwinia chrysanthemi*.

La cepa resultante, SZ186, produjo niveles insignificantes de co-productos pero no logró utilizar completamente un 10% de azúcar en un medio de sales minerales con o sin betaína (Figura 7A; tabla 5).

Sin embargo, los rendimientos basados en azúcar metabolizado fueron altos (96%-99%) para tanto SZ162 como SZ186.

[0069] Las delecciones en SZ136 que eliminaron vías de co-producto (SZ186) también redujeron el rendimiento celular casi la mitad, afectando negativamente a la segmentación de carbono en biosíntesis.

Se usó evolución metabólica para co-seleccionar un derivado de SZ186 con crecimiento y rendimiento de fermentación mejorados en presencia de 1 mM de betaína y 10% de glucosa (figura 7A y 7B).

El rendimiento celular y la producción de ácido orgánico aumentaron al mismo tiempo durante las etapas de selección iniciales.

Un único clon fue aislado del último enriquecimiento y designado SZ194.

[0070] La cepa SZ194 creció más rápidamente que SZ186 y alcanzó un rendimiento celular más alto.

Concentraciones de lactato de hasta 900 mM fueron producidas por SZ194 en algunas fermentaciones, consistentemente superiores a las de SZ186 (tabla 5).

Ambas cepas produjeron lactato a partir de glucosa a rendimientos teóricos cerca de co-productos mínimos.

Con ambas cepas, sin embargo, el azúcar permaneció sin usar a pH 7.0 incluso después de una incubación prolongada.

A pH 7.0, los 800-900 mM de lactato producido del 10% (p/v) de glucosa está bastante por encima de la concentración de lactato máxima necesitada para inhibir el crecimiento a pH 7.0 y también puede inhibir el posterior metabolismo de la glucosa.

[0071] Se exploraron dos factores como posible causa para la fermentación incompleta de 10% (p/v) de azúcar por SZ194: un defecto nutricional desconocido y la tolerancia al lactato.

El reemplazo del medio de sales minerales que contenía 1 mM de betaína con caldo de Luria (medio rico) a pH 7.0 apenas tuvo efecto en el rendimiento del lactato (tabla 5) o en la producción de lactato (tabla 6).

La toxicidad de lactato fue evaluada por comparación del efecto de pH en la fermentación (tabla 5).

La toxicidad de ácidos orgánicos débiles tales como el lactato está relacionada en parte con la acción de desacoplamiento de la forma neutral conjugada (Warnecke et al., 2005), que a su vez está inversamente relacionada con el pH.

Una tendencia similar fue observada para la fermentación.

En caldo de Luria, los títulos de lactato finales fueron mínimos a pH 6.5 y máximos a pH 7.5 y pH 8.0.

Los cambios en el pH tuvieron menos efecto en el rendimiento celular.

A pH 7.5, 10% (p/v) se fermentó glucosa completamente en 72 h usando caldo de Luria.

Tabla 6. Comparación de la productividad de lactato

Cepa	Condiciones de fermentación ^a	Título de lactato (mmol l ⁻¹)	Rendimiento celular (gl ⁻¹)	Productividad volumétrica ^b (mmol l ⁻¹ h ⁻¹)	Productividad específica ^b (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Productividad volumétrica ^b (gl ⁻¹ h ⁻¹)
SZ132	pH 7.0	930	2.07	24.6	11.9	2.21
SZ194	pH 7.0	824	1.73	18.5	10.7	1.67
SZ194	pH 7.5	1020	1.67	23.8	14.2	2.14
SZ194	Caldo de Luria, pH 7.5 sin betaína añadida	1070	1.75	24.7	14.1	2.22

^a sales Minerales (NBS) con 10% (p/v) de glucosa y 1 mM de betaína, a menos que se especifique lo contrario.
^b valores calculados según el promedio para el periodo de 24-h más productivo.

[0072] El beneficio de este aumento en el pH fue confirmado en el medio de sales minerales con 1 mM de betaína (Figura 8; Tabla 5).

A pH 7.5, se fermentaron 10% y 12% (p/v) de glucosa completamente, produciendo más de 1 mol de lactato l⁻¹ con sólo cantidades residuales de co-productos (Figura 3A).

Los rendimientos de producto de 0,95 g de lactato por g de glucosa representan un 95% del rendimiento teórico máximo basado en azúcar total añadido a la fermentación.

La adición de niveles más altos de azúcar no aumentó más los títulos de lactato finales.

Títulos finales similares se observaron durante experimentos con lotes alimentados (figura 8B) y no aumentaron cuando se añadió azúcar adicional.

Los títulos de lactato finales de aproximadamente 1,0-1,2 M parecen representar un límite superior para el metabolismo de azúcar a pH 7.5 por SZ194 (tabla 5).

[0073] Es interesante destacar que el pH 7.5, el pH óptimo para la fermentación, es muy próximo al observado para

el citoplasma de *E. coli* (Axe et al., 1995; Warnecke et al., 2005).

Aunque no se ha identificado ningún gen transportador de lactato en *E. coli*, diferentes estudios han proporcionado pruebas de su presencia en bacterias de *E. coli* y de ácido láctico (Axe et al., 1995; Konings, 2002; Poolman, 2002).

Se cree que estos transportadores son simportadores de lactato/H⁺, actividades que pueden aumentar en eficiencia con aumentos en el pH externo.

Según el "energy recycling model" (Michels et al., 1979), el flujo de salida mediado por portador de productos finales metabólicos tales como el lactato puede llevar a la generación de un gradiente de protones electroquímico a través de la membrana y contribuir a la producción de ATP.

Se estima que el flujo de salida de lactato en bacterias de ácido láctico contribuye un 30% de la energía celular total (van Maris et al., 2004a).

Ya que *E. coli* SZ194 y las bacterias del ácido láctico metabolizan la glucosa por vías similares, es posible que ATP adicional se produzca por flujo de salida de lactato en *E. coli*.

[0074] La pureza quiral del lactato producido por SZ194 fue examinada y se descubrió que era superior que 95% de d-lactato.

Aunque es buena, esta pureza quiral es inferior a la de la cepa progenitora, SZ132 (99.5% de d-lactato) (Zhou et al., 2005).

La fuente de esta impureza quiral se desconoce.

[0075] Según la presente invención, se pueden producir títulos de lactato de más de 1 M mediante *E. coli* SZ194 a pH 7,5 en un medio de sales minerales suplementado con 1 mM de betaína.

En este medio, la productividad de lactato y el rendimiento celular para SZ194 fueron equivalentes al del caldo de Luria (tabla 6).

El título final del lactato de 110 g l⁻¹ y el rendimiento (0,95 g de lactato g de glucosa⁻¹) para la cepa SZ194 son comparables favorablemente con las bacterias de ácido láctico tales como *L. helveticus* (Kyla-Nikkila et al., 2000) y *L. delbrueckii* (Demirci et al., 1992) y exceden el rendimiento de biocatalizadores previamente modificados genéticamente en medio rico o en sales minerales (Dien et al., 2001; Porro et al., 1999; Saitoh et al., 2005; van Maris et al., 2004b).

Ejemplo 3

Materiales y métodos

Cepas, plásmidos, medios y condiciones de cultivo

[0076] Las cepas, plásmidos y cebadores de *E. coli* utilizados en este estudio se enumeran en la tabla 7.

la cepa SZ194 fue previamente construida de un derivado de *E. coli* B (ATCC 11303) y sirvió como punto de partida para construcciones (véase el Ejemplo 2 y Zhou et al., 2006).

Durante las construcciones de cepas, se cultivaron cultivos aeróbicamente a 30°C, 37°C, o 39°C en caldo de Luria (por litro: 10 g de triptona de Difco, 5 g de extracto de levadura Difco y 5 g de cloruro sódico) (Miller 1992) que contenía 2% (p/v) de glucosa o de arabinosa.

Ampicilina (50 mg/L), tetraciclina (12.5 o 6.25 mg/L), o canamicina (25 o 50 mg/L) fueron añadidas según fue necesario.

Para las pruebas de fermentación, se cultivaron cepas sin antibióticos a 37°C en el medio de sales minerales NBS (Causey et al., 2004) suplementado con 1 mM de betaína y 2-12% (p/v) de glucosa.

Un tampón de MOPS (100 mM, pH 7.4) se añadió a un medio sólido y líquido en condiciones en las que faltaba un control del pH (placas, tubos, matraces).

Métodos genéticos

[0077] Se siguieron protocolos de fabricantes y métodos estándar (Miler 1992, Sambrook y Russell 2001) para la purificación de ADN, (Qiagen) la digestión de endonucleasa de restricción (New England Biolabs), amplificación de ADN (Stratagene e Invitrogen) y transformación.

Se han descrito métodos para deleciones cromosómicas e integración previamente (Causey et al., 2004, Zhou et. al, 2003, Datsenko y Wanner 2000, Martinez-Morales et al., 1999).

Cebadores híbridos (tabla 7) que contienen homólogos de secuencia para los 50 nucleótidos del principio o del final del gen *mgsA* (cursiva) más 20 nucleótidos correspondientes a la secuencia del casette de canamicina flanqueado por *FRT* (subrayado) de pKD4 fueron usados para la deleción del gen *mgsA* nativo.

El plásmido pLOI2398 fue construido previamente para facilitar la integración de *Pediococcus acidilactici* *ldhL* en el gen cromosómico *ldhA* de *E. coli* (Zhou et al., 2003a).

Fermentaciones

[0078] Se cultivó un preinóculo mediante la inoculación de una colonia en un matraz de 250 ml (100 ml de medio NBS con 2% (p/v) de glucosa y 100 mM de MOPS, pH 7.4).

Después de 16 h (37°C, 120 r.p.m.), este preinóculo fue diluido en cubas de fermentación de 500 ml que contenían

350 ml de medios NBS (5-12% de azúcar, con o sin 1 mM de betaína) para proporcionar 33 mg de peso seco celular l^{-1} .

Después de 24-h (37°C, 150 r.p.m., pH controlado a 7.0), este cultivo fue usado para proporcionar un inóculo de inicio de 33 mg de peso seco celular l^{-1} .

5 Se observó una productividad volumétrica para el periodo más activo de 24-h.

La productividad específica fue calculada como el cociente de la productividad volumétrica dividida por la masa celular a 24 h.

10 Evolución metabólica

[0079] Las células de fermentaciones controladas por pH fueron transferidas en serie a intervalos de 24 o 48 h para facilitar la evolución metabólica a través de selección competitiva basada en el crecimiento.

En cada transferencia se diluyeron inóculos (1/100 a 1/350) en medios precalentados frescos.

A los clones aislados de estas selecciones se les asignaron nuevas designaciones de cepa.

15

Análisis

[0080] La masa celular fue estimada por medición de la densidad óptica a 550 nm utilizando un espectrofotómetro Spectronic 70 de Bausch & Lomb.

20 La producción de ácido orgánico total, principalmente de lactato, se estimó por el consumo de hidróxido de potasio usado para mantener el pH 7.0.

Los productos ácidos y la pureza quiral fueron analizados al final de la fermentación por cromatografía en fase líquida de alta eficacia.

25 Las estimaciones de ácido orgánico por consumo de base fueron constantemente inferiores a las mediciones de lactato por HPLC, presuntamente debido al metabolismo mineral.

Resultados y discusión

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

30

[0081] Se ha observado que la cepa SZ194 produce eficazmente D-(-)-lactato de glucosa a un 99% de pureza quiral en un medio de sales minerales (Zhou et al., 2006).

La betaína aumentó la productividad del lactato (título e índice) con concentraciones altas de azúcar pero también disminuyó la pureza quiral a un 95% (tabla 8).

35 Hay diferentes fuentes posibles de L-(+)-lactato en *E. coli* (figura 9A).

El L-(+)-lactato se puede producir a partir de lactaldehído, un intermediario en el catabolismo de ramnosa o fucosa (Badia et al., 1991), ambos ausentes en nuestros medios, y como un producto del bypass de metilglioxal de la glucólisis (figuras 9A y 9B).

40 El bypass de metilglioxal representa una vía de desbordamiento corta que es inducida por la acumulación de dihidroxiacetona fosfato durante la glucólisis rápida, y por una limitación de fosfato para síntesis de ATP.

Tanto la acumulación de dihidroxiacetona fosfato y la limitación de fosfato podría ser exacerbada por índices altos de flujo glucolítico.

Para probar esta hipótesis, el gen *mgsA* que codifica el primer paso realizado, sintasa de metilglioxal, fue eliminado.

La cepa resultante, TG112, produjo D-(-)-lactato quiralmente puro (Tablas 8 y 9, Figuras 10A y 10B).

45 El crecimiento y la productividad inicial aumentaron por esta delección en comparación con SZ194.

Los rendimientos basados en análisis con HPLC fueron similares (tabla 8).

[0082] Otras mejoras en TG112 fueron seleccionadas por evolución metabólica durante 81 días de cultivo (figura 11).

50 Los cultivos de fermentación fueron transferidos en serie en medio de sales minerales con 10% (p/v) de glucosa, 12% (p/v) de glucosa, y 12% (p/v) de glucosa con 1 mM de betaína.

Un clon fue aislado el día 28 (TG113) y otro al final del enriquecimiento (TG 114).

La productividad (índice, título, y rendimiento) del D-(-)-lactato y el rendimiento celular mejoraron durante este proceso (figuras 10A y 10B; tabla 8 y tabla 9).

55 la fermentación con SZ114 fue sustancialmente completada dentro de 48 h en la mayoría de experimentos, con un rendimiento final de 0,98 g de D-(-)-lactato g^{-1} glucosa.

Inóculos altos proporcionaron una mejora modesta en las productividades específicas y volumétricas.

Los co-productos e impurezas quirales estuvieron por debajo del umbral de detección (<0.1%) con estas cepas sin *mgsA*.

60 La producción de D-(-)-lactato por TG114 es favorable en comparación con otros biocatalizadores y ofrece una alta productividad, título, rendimiento y pureza quiral con medios y condiciones de fermentación simples (tabla 10).

Producción de L-(+)-lactato quiralmente puro

65 [0083] La cepa de D-(-)-lactato, SZ194, fue modificada genéticamente de nuevo para producir principalmente L-(+)-lactato por sustitución del gen nativo *ldhA* que codifica una deshidrogenasa de D-(-)-lactato con el gen *ldhL* de *P.*

acidilactici que codifica L-(+)-lactato deshidrogenasa (Zhou et al., 2003a).

La cepa resultante, TG102, produjo principalmente L-(+)-lactato y fue transferida en serie en un medio mínimo con un 5% (p/v) de glucosa, 10% (p/v) de glucosa y 10% (p/v) de glucosa con 1 mM de betaína para seleccionar un crecimiento y productividad mejorados.

5 Después de 24 días, un clon fue seleccionado y designado TG103.

Aunque la productividad del lactato mejoró debido a un aumento en el flujo glucolítico (figuras 10C y 10D; tabla 9), el L-(+)-lactato fue contaminado con 5% de D-(-)-lactato (tabla 8).

Ya que el bypass de metilglixal tiene el potencial de producir ambas formas quirales de lactato, *mgsA* fue identificado como la fuente más probable de impureza quiral.

10 La pureza quiral absoluta fue restaurada después de la delección de *mgsA*.

La cepa resultante, TG105, produjo sólo L-(+)-lactato (figuras 10 y 10D; tabla 8).

Otras mejoras se lograron mediante coselección del crecimiento y la productividad durante transferencias en serie en el medio de sales minerales con 10%-12% (p/v) de glucosa y 1 mM de betaína (dilución de inóculo de 1:100 a 1:350).

15 TG106 Y TG107 fueron aisladas como cepas intermedias después de 10 y 22 transferencias, respectivamente (figuras 10E y 10F).

La cepa TG108 fue aislada después de 99 días.

Todas produjeron sólo L-(+)-lactato a altos rendimientos con niveles mínimos de co-productos (tabla 8).

Las productividades volumétricas en 12% (p/v) de glucosa y el rendimiento celular aumentaron durante la selección de la cepa aunque la productividad específica se mantuvo esencialmente constante (tabla 9).

20 Pequeños aumentos en la productividad volumétrica máxima (periodo de 24-h más activo) fueron observados con inóculos más altos.

[0084] La cepa TG108 fue comparada con otros biocatalizadores para la producción de L-(+)-lactato (tabla 10).

25 El título y rendimiento para esta cepa fueron más altos que los observados en otros organismos.

Otras ventajas incluyen condiciones de fermentación y medio simples, y pureza quiral.

Conclusiones

30 [0085] Los títulos altos (>100 g^l en 48 h) de L-(+) y D-(-)-lactato quiralmente puros (> 99.9% de pureza quiral) pueden ser fácilmente producidos por *E. coli* B recombinante en el medio de sales minerales suplementado con 1 mM de betaína.

La eliminación del bypass de metilglixal fue esencial para eliminar las impurezas en los enantiómeros D-(+) y L-(-) de lactato.

35 Ejemplo 4

Construcción de TG128 por eliminación de todo el ADN foráneo de TG114

40 [0086] Para facilitar la aplicación comercial de cepas de *E. coli* recombinante para la producción de lactato, se construyó otro derivado de TG114 en el que todo el ADN foráneo que había quedado en el cromosoma durante la modificación genética precedente fue eliminado.

El ADN eliminado incluía regiones de cicatriz que contenían el sitio de diana de reconocimiento de flipasa (FRT) para la flipasa (recombinasa) usada para eliminar los marcadores antibióticos, pequeños fragmentos de ADN de

45 *Zymomonas mobilis*, parte de *casAB* de *Klebsiella oxytoca*, y parte de *celY* de *Erwinia chrysanthemi*.

Estos segmentos de ADN foráneos fueron completamente eliminados, dejando sólo ADN cromosómico nativo cuyas regiones centrales de genes seleccionados han sido eliminadas para mejorar la producción de lactato.

Cepas, plásmidos, medios y condiciones de cultivo

50 [0087] Las cepas, plásmidos y cebadores de *E. coli* usados en este estudio se enumeran en la tabla 11.

La cepa TG114 fue construida previamente a partir de un derivado de *E. coli* B (ATCC 11303) y sirvió como punto de partida para otras construcciones (Grabar et al., 2006).

55 Durante las construcciones de cepas, se cultivaron cultivos aeróbicamente a 30°C, 37°C, o 39°C en caldo de Luria (por litro: 10 g de triptona de Difco, 5 g de extracto de levadura Difco y 5 g de cloruro sódico) (Miller 1992) con 2% (p/v) de glucosa o arabinosa o 10% de sacarosa.

Ampicilina (50 mg/L), clorotetraciclina (10 mg/L), o cloranfenicol (40 mg/L) se añadieron según fue necesario.

60 [0088] Los cultivos fueron mantenidos en placas que contenían un medio de sales minerales NBS (Causey et al., 2004) suplementado con 2% (p/v) de glucosa.

Un tampón de MOPS (100 mM, pH 7.4) se añadió a medio sólido y líquido bajo condiciones carentes de control de pH (placas, tubos, matraces).

65 Para las pruebas de fermentación, se cultivaron cepas sin antibióticos a 37°C en medio de sales minerales AM1 (por litro: 2,63 g de (NH₄)₂HPO₄, 0,87 g NH₄H₂PO₄, 0,37 g de MgSO₄·7H₂O, 2,4 mg de FeCl₃, 0,3 mg de CoCl₂·6H₂O, 0,15 mg de CuCl₂, 0,3 mg de ZnCl₂·4H₂O, 0,3 mg de NaMoO₄, 0,075 mg de H₃BO₃, 0,075 mg de MnCl₂·4H₂O, 1 mM de betaína y 120 g/L de glucosa).

Métodos genéticos

5 [0089] Se siguieron protocolos de fabricantes y métodos estándar (Miller 1992, Sambrook y Russell 2001) para la clonación de genes (Invitrogen), la purificación de ADN (Qiagen), la digestión de endonucleasa de restricción (New England Biolabs), la amplificación de ADN (Stratagene e Invitrogen) y transformación. Métodos para realizar deleciones cromosómicas e integración se han descrito previamente (Causey et al., 2004, Zhou et. al, 2003, Datsenko y Wanner 2000, Martinez-Morales et al., 1999). Una descripción de los plásmidos y los cebadores usados aparece en la tabla 11.

10 Construcciones de plásmidos

15 [0090] El plásmido pLOI4411 fue generado designando cebadores que amplificaron entre el operón *frdABCD* de *E. coli* B gADN, '*frdA frdB frdC y frdD*', y ligamiento posterior en el vector de clonación de Invitrogen, pCR2.1-TOPO (tabla 11).

Los plásmidos pLOI4412, pLOI4413, pLOI4415 y pLOI4416 fueron construidos con un método similar para clonar los genes nativos de interés, *ackA*, *adhE*, *focA plfB* y *mgsA*, respectivamente.

20 [0091] Se generaron plásmidos que codifican el bloqueo de genes continuos usando cebadores antisentido. Se diseñaron cebadores antisentido con grupos de fosfato 5' para amplificar el plásmido entero menos la región de gen que iba a ser omitida (figura 12).

Por ejemplo, pLOI4417 fue generado mediante la realización de PCR en pLOI4411 con un cebador que se alinea al extremo 3' de *frdA*, que se extiende en dirección ascendente, y un cebador que se alinea dentro de *frdC*, que se extiende en dirección descendente.

25 El resultante producto de PCR de 4263 pb fue tratado con la enzima de restricción *DpnI* para asimilar el plásmido pLOI4411 nativo.

Los productos de PCR digeridos fueron posteriormente autoligados para generar el plásmido nuevo, pLOI4417.

Los plásmidos pLOI4418, pLOI4419, pLOI4421 y pLOI4422 fueron generados de una forma similar usando los sets de cebadores listados en la tabla 11.

30 Estos plásmidos sirvieron como un modelo de PCR para amplificar el ADN lineal que contenía la deleción deseada y fueron desprovistos de toda secuencia heteróloga.

Este ADN lineal fue usado para reemplazar regiones decicatrices de FRT, ADN heterólogo, y *sacB* por recombinación homóloga (doble entrecruzamiento).

De esta manera, se hicieron deleciones continuas de genes seleccionados en el cromosoma.

35 Eliminación de regiones de cicatrices de FRT y ADN heterólogo de TG114

[0092] Las cicatrices de la diana de reconocimiento FLP (FRT) de ~85 pb que dejó el método de deleción en una única fase de Datsenko y Wanner (2000) fueron quitadas por un método en dos etapas.

40 En primer lugar, se dirigió a los sitios FRT individualmente un cassette circular *FRT-cat-sacB* dando como resultado una única integración de entrecruzamiento de este cassette en una cicatriz FRT en el cromosoma (*FRT-cat-sacB-FRT*).

45 El ADN Circular con el cassette *cat-sacB-FRT* fue construido de la siguiente manera: 1. Amplificación de PCR del cassette *FRT-cat-sacB* que usa el plásmido pLOI4151 como modelo. El cassette amplificado incluía sitios *PstI* flanqueantes; 2) digestión con *PstI* seguida por autoligamiento para producir círculos cerrados incapaces de replicación autónoma. Este ADN circular fue usado para la integración. La expresión del gen CAT confirió resistencia al cloranfenicol y permitió la selección directa de células con la integración.

50 [0093] En el segundo paso, el gen *sacB* permitió una selección directa de células en las que la región de ADN que contiene *sacB* se ha quitado por recombinación homóloga (doble entrecruzamiento).

Las células que expresan *sacB* en presencia de 10% de sacarosa (Ausubel et al., 2005; abrigo et al., 2001) fueron matadas y lisadas por la producción intracelular de polisacárido.

Con este método, las recombinantes donde se había insertado ADN para reemplazar *sacB* pudieron ser seleccionados a partir de poblaciones grandes.

55 En este ejemplo, la integración de un fragmento de ADN lineal a través de un doble entrecruzamiento resultó en una cepa de bloqueo limpia que contiene sólo ADN nativo o ADN nativo con deleciones, carente de todo ADN heterólogo.

Se usó una secuencia de ADN nativa o una secuencia nativa con una deleción génica deseada en este segundo paso para eliminar completamente regiones de cicatriz de FRT y todo el ADN heterólogo de la cepa TG114.

60 [0094] Tras la electroporación con el fragmento de ADN lineal, las células fueron incubadas con agitación a 37°C durante 4 horas en 1 mL de medio SOC.

Después de 4 horas de cultivo, las células fueron incubadas durante 16-20 horas en 50 mL de LB sin sal (por litro: 10 g de triptona de Difco, 5 g de extracto de levadura de Difco) suplementado con 10% (p/v) de sacarosa.

65 Luego las células fueron puestas en placas de agar LB sin sal suplementadas con 5% de sacarosa.

La mayoría de las células que mantenían *FRT-cat-sacB* no fueron viable después de periodos prolongados en presencia de sacarosa.

Las células viables que formaron colonias fueron desprovistas de *sacB*, y regiones de cicatriz.

5 [0095] Este método fue usado secuencialmente para eliminar las 5 cicatrices FRT presentes en TG114 y para restaurar el operón *lac*.

Los cebadores, plásmidos, y cepas usados en este proceso se resumen en la tabla 11.

Los genes *casAB* integrados en *lacA* fueron también quitados y sustituidos por secuencias de tipo salvaje en esta región que utiliza una modificación de este método en dos etapas.

10 Los fragmentos de *celY* de *Erwinia chrysanthemi* (y *Z. ADN mobilis*) integrados en *frdA* fueron quitados durante la construcción de la delección *frdBC* continua.

La cepa resultante, TG128, está desprovisto de cicatrices de FRT y contiene sólo secuencias de ADN nativo con regiones delecionadas en los genes indicados en la tabla 11.

15 Una comparación de la secuencia original en la región de delecciones de gen se muestra para TG114 y TG128 (tabla 12).

Restauración del operón *lac* nativo

20 [0096] TG114 contenía segmentos de ADN heterólogo (fragmentos de ADN de *Zyomononas mobilis*, *casAB* de *Klebsiella oxytoca*, y parte de *celY* de *Erwinia chrysanthemi*) de construcciones previas en la región *lacY*, *lacA* (Grabar et al., 2006).

Estos fueron eliminados de TG120 para producir TG122 y están ausentes en derivados posteriores de TG122.

Los cebadores para esta construcción se enumeran en la tabla 11.

25 Para lograr esto, la región nativa *lacZ'* a *cynX* fue amplificada de *E. coli* B y clonada en pCR2.1-TOPO para producir pLOI3956.

Para facilitar la selección de recombinantes, la región central de pLOI3956 (*lacZ'*-*lacA'*) fue sustituida con un cassette que contenía genes *cat* y *sacB* de la siguiente manera.

Con pLOI3956 como modelo, se usaron cebadores antisentido con sitios de *NheI* para amplificar *lacZ'*, pCR2,1, y *cynX* (omitiendo parte de *lacZ'*, *lacY*, *lacA* y parte de *cynX*).

30 Un segundo conjunto de cebadores que contenía sitios de *NheI* fue usado para amplificar un cassette de *cat-sacB* del plásmido pEL04 (originalmente conocido como pK04, Ausubel et al., 2005 and Lee et al., 2001).

Después de la digestión con *NheI*, estos productos PCR fueron ligados para producir pLOI3957, un derivado de pCR2.1 que contiene *lacZ'*-*sacB*-*cat*-*cynX*.

35 Utilizando el plásmido pLOI3957 como modelo, la región *lacZ'*-*sacB*-*cat*-*cynX'* fue amplificada por PCR e integrada en TG120 con selección para la resistencia de cloranfenicol para producir TG121.

Utilizando pLOI3956 como modelo, la región de tipo salvaje *lacZ'*-*lacY* *lacA*-*cyn* región fue amplificada por PCR e integrada en TG121.

Los integrantes que contenían la secuencia nativa del operón *lacZYA* fueron seleccionados por la ausencia de la función de *sacB* durante el cultivo en presencia de sacarosa.

40 Uno de estos fue designado TG122.

La cepa TG122 fue una cepa intermedia durante la construcción de TG128.

Fermentaciones

45 [0097] El preinóculo se cultivó por inoculación de una colonia en un matraz de 250-ml con 100 ml de de medio NBS (Causey et al., 2004) con 2% (p/v) de glucosa de y 100 mM de MOPS (pH 7.4).

Después de 16 h (37°C, 120 r.p.m.), este preinóculo fue diluido en cubas de fermentación de 500-ml con 350 ml de medios de sales minerales AF1 (12% de azúcar) para proporcionar 33 mg de peso seco celular o dcw/L.

50 Después de 24-h (37°C, 150 r.p.m., pH controlado a 7.0), el cultivo resultante fue usado para proporcionar un inóculo inicial de 33 mg de dcw/L e incubado bajo las mismas condiciones durante 96 h. Se retiraron muestras para análisis.

Análisis

55 [0098] La masa celular se estimó por medición de la densidad óptica en 550 nm utilizando un espectrofotómetro Spectronic 70 de Bausch & Lomb.

La producción de ácido orgánico total, principalmente de lactato, fue estimada por consumo de hidróxido de potasio usado para mantener el pH a 7.0.

Los productos ácidos y la pureza quiral fueron analizados al final de la fermentación por cromatografía en fase líquida de alta eficacia.

60 Las estimaciones de ácido orgánico por consumo de base fueron constantemente inferiores a las medidas de lactato por HPLC, supuestamente debido al metabolismo mineral.

Fermentación de glucosa por TG128

65 [0099] La cepa TG114 fue sometida a manipulación genética intensiva para eliminar cicatrices FRT y otro ADN extraño.

El organismo resultante, la cepa TG128, contiene solo secuencias de ADN de tipo salvaje y nativo, y delecciones continuas de genes para eliminar productos de fermentación no deseados.

El rendimiento de fermentación de esta cepa fue esencialmente equivalente al de la cepa TG114, y el rendimiento de lactato fue de 96-98% del rendimiento teórico máximo (tabla 13).

5 Selección de mutantes termotolerantes para la producción de lactato por evolución metabólica

[0100] Se usó la evolución metabólica para seleccionar cepas capaces producir lactato de forma eficaz a temperaturas elevadas.

10 Células de fermentaciones controladas por pH fueron transferidas en serie a intervalos de 24 h para facilitar la evolución metabólica a través de selección competitiva basada en el crecimiento.

En cada transferencia, se diluyeron inóculos (1/100 a 1/350) en medios precalentados frescos. La temperatura de incubación fue aumentada en una fracción de un grado ya que el crecimiento permitía facilitar el aislamiento de cepas termotolerantes.

15 La cepa TG128 fermenta óptimamente a 37°C. Se obtuvieron mutantes aumentando progresivamente la temperatura de incubación durante transferencias sucesivas.

Con este método, se seleccionaron cepas nuevas de TG128 que ahora son capaces de fermentar eficazmente a 39°C (cepa TG129) y a 43°C (cepa TG130).

20 Los rendimientos para ambas cepas termotolerantes a temperatura elevada fueron equivalentes a TG114 a 37°C (tabla 13).

Fermentación de glucosa por TG128

25 [0101] La cepa TG114 fue sometida a manipulación genética intensiva para eliminar cicatrices FRT y otro ADN extraño.

El organismo resultante, la cepa TG128, contiene solo secuencias de ADN de tipo salvaje y nativo, secuencias de ADN de tipo salvaje y delecciones continuas de genes para eliminar productos de fermentación no deseados.

El rendimiento de fermentación de esta cepa fue esencialmente equivalente al de TG114, y el rendimiento de lactato fue de 96-98% del rendimiento teórico máximo (tabla 13).

Selección de mutantes termotolerantes para la producción de lactato

35 [0102] Se utilizó la evolución metabólica para seleccionar cepas capaces producir de lactato eficazmente a temperaturas elevadas.

Las transferencias en serie en fermentadores donde la temperatura fue aumentada una fracción de un grado permitieron el aislamiento de TG129, que fermenta óptimamente a 39°C, y TG130, que fermenta óptimamente a 43°C.

40 Los rendimientos para ambas a temperatura elevada fueron equivalentes a TG114 a 37°C (tabla 13).

Tabla 7. Cepas, plásmidos y cebadores de *E. coli* usados en este estudio

Plásmido o cepa	Características relevantes	Fuentes
Cepas		
SZ194	<i>pflB frd adhE ackA</i>	Zhou <i>et al.</i> (2006)
TG102	SZ194, $\Delta IdhA::ldhL$ -FRT	Este estudio
TG103	Mutante de TG102 con crecimiento y actividad de <i>ldhL</i> mejorada	Este estudio
TG105	TG103, $\Delta mgsA::FRT$	Este estudio
TG106, TG107 y TG108	Mutantes de TG105 con crecimiento y actividad de <i>ldhL</i> mejorada	Este estudio
TG112	SZ 194, $\Delta mgsA::FRT$	Este estudio
TG 113 y TG 114	Mutante de TG112 con crecimiento y actividad de <i>ldhL</i> mejorada	Este estudio
Plásmidos		
pKD46	<i>bla</i> y β <i>exo</i> (recombinasa roja), replicón pSC101 dependiente de la temperatura	Datsenko and Wanner (2000)
pFT-A	<i>bla flp</i> replicón pSC101 dependiente de la temperatura	Posfai <i>et al.</i> (1997)
pKD4	<i>bla kan</i> ; R6K ori; FRT- <i>kan</i> -FRT cassette	Datsenko and Wanner (2000)
PLOI2398	<i>kan</i> ; <i>ldhA'</i> - <i>ldhL</i> -FRT <i>tet</i> -FRT <i>ldhA</i> ; R6K ori	Zhou <i>et al.</i> (2003)
Cebadores		
Cebador sentido para la delección de <i>mgsA</i>	<i>Atgtacattatggaactgacgactcgcactttacctgcgcgg aaacatatgtgtaggctggagctgcttc</i> (SEC ID N°:7)	Este estudio

Cebador antisentido para la delección de *mgsA*

Ttacttcagacggtccgagataacgctgataatcgggga tcagaatacatatgaatatcctccttaq (SEC ID N°:8)

Este estudio

Cepa	Condiciones ^a	Lactate			Co-productos (mmol l ⁻¹)		
		mmol l ⁻¹	Rendimiento(%) ^b	Pureza quirál (%)	Succinato	Acetato	Etanol
SZ194	NBS, pH 7.5 +betaína	1228 ± 31	95	95	< 1	< 1	< 1
<u>TG 102</u>	NBS 5% glucosa	555 ± 6	99	99.5	< 1	< 1	< 1
<u>TG102</u>	NBS 10% glucosa	697 ± 13	96	99.5	< 1	< 1	< 1
<u>TG102</u>	NBS 10% glucosa + betaína	1025 ± 18	94	95	< 1	< 1	< 1
<u>TG103</u>	NBS 10% glucosa + betaína	1080 ± 15	95	95	< 1	< 1	< 1
<u>TG105</u>	NBS + betaína	969 ± 20	95	>99.9	< 1	< 1	< 1
<u>TG106</u>	NBS + betaína	1055 ± 19	95	>99.9	< 1	< 1	< 1
<u>TG107</u>	NBS + betaína	1135 ± 18	96	>99.9	< 1	< 1	< 1
<u>TG108</u>	NBS + betaína	1287 ± 15	98	>99.9	< 1	< 1	< 1
TG112	NBS 10% glucosa + betaína	926 ± 13	95	>99.9	< 1	< 1	< 1
TG113	NBS + betaína	1068 ± 32	95	>99.9	< 1	< 1	< 1
TG114	NBS + betaína	1314 ± 48	98	>99.9	< 1	< 1	< 1

^a medio de sales minerales NBS que contiene un 12% (p/v) de glucosa(pH 7.0) a menos que se especifique lo contrario. Donde se indica, también se añadió 1 mM de betaína. Las cepas en negrita producen D-(-)-lactato. Las cepas subrayadas producen L-(+)-lactato.

^b los rendimientos se basan en azúcar metabolizado que asume un rendimiento teórico máximo de 2 moles de lactato por mol de hexosa (conversión a mismo peso).

Cepa ^a	Título del lactato (mmol l ⁻¹)	Rendimiento celular (g l ⁻¹)	Productividad volumétrica ^f (mmol l ⁻¹ h ⁻¹)	Productividad específica ^b (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Productividad volumétrica ^f (g l ⁻¹ h ⁻¹)
SZ194^p	1228	1.70	23.3	13.7	2.10
<u>TG1036^e</u>	1083	2.12	30.1	14.2	2.71
<u>TG105^e</u>	969	1.84	21.1	11.5	1.90
<u>TG106</u>	1055	1.98	24.1	12.1	2.17
<u>TG107</u>	1135	2.21	26.7	12.1	2.40
<u>TG108</u>	1287	2.29	26.2	11.4	2.29
<u>TG108^c</u>	1273	2.15	26.4	12.3	2.37
<u>TG108^d</u>	1268	2.36	30.0	12.7	2.70
TG112^e	926	1.84	20.4	11.1	1.84
TG113	1068	1.90	21.3	11.2	1.92
TG114	1314	2.31	32.2	13.9	2.88
TG114^c	1204	2.05	33.9	16.6	3.05
TG114^d	1202	2.16	36.1	16.7	3.25

^a sales minerales NBS que contienen un 12% (p/v) de glucosa (pH 7.0), 1mM de betaína, controladas a pH 7.0 (a menos que se especifique lo contrario). Las cepas en negrita producen D-(-)-lactato. Las cepas subrayadas producen L-(+)-lactato.

^b pH controlado a 7.5

^c 5% de inóculo.

^d 10% de inóculo.

Tabla 10. Producción de lactato quiral a partir de glucosa por bacterias, levaduras y hongos

Organismos	Medios, sustratos y condiciones del proceso	Lactato (gl ⁻¹)	Rendimiento (%)	Productividad volumétrica (gl ⁻¹ h ⁻¹)	Isómero y pureza	Referencia
<i>E. coli</i> TG 114	sales, 1mM de lote de betaína, glucosa , 120 g l ⁻¹	118	98	2.88	D-(-) >99.9%	Este estudio
<i>E. coli</i> JP203	medio rico (LB) dos etapas, glucosa de lote alimentado, 115 g l ⁻¹	62	54	1.09	D-(-) No consta	Chang <i>et al.</i> 1999
Mutante de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> DP3	extracto de levadura, lote alimentado, glucosa, 210 gl ⁻¹	117	56	6.5	D-(-) No consta	Demirci <i>et al.</i> 1992
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CD590	medio rico (YPD), glucosa microaeróbica , 100 g l ⁻¹	81	81	1.5	D-(-) 99%	Rajgarhia <i>et al.</i> 2004
<i>E. coli</i> TG108	Sales, 1mM de lote de betaína, glucosa , 120 gl ⁻¹	116	98	2.3	L-(+) >99.9%	Este estudio
<i>E. coli</i> JP204 (pLS65)	medio rico (LB) dos etapas, glucosa de lote alimentado , 155 g l ⁻¹	47	30	0.7	L-(+) No consta	Chang <i>et al.</i> 1999
<i>E. coli</i> FBR11 (pVALDH1)	Medio rico (LB), lote simple, glucosa, 100gl ⁻¹	73	73	2.3	L-(+) No consta	Dien <i>et al.</i> 2001
<i>Kluyveromyces lactis</i> BM3-12D (pLAZ10)	Extracto de levadura y vitaminas lote alimentado, glucosa de aireación, 110 g l ⁻¹	60	55	No consta	L-(+) No consta	Bianchi <i>et al.</i> 2001
<i>Kluyveromyces lactis</i> PMI/C1 (pEPL2)	extracto de levadura y extracto soluble de maíz, lote alimentado con aireación, glucosa , 200 g l ⁻¹	109	55	No consta	L-(+) No consta	Porro <i>et al.</i> 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RWB850-2	Glucosa suplementada con vitamina y en dos fases, 18gl ⁻¹	12	67	No consta	L-(+) No consta	Van Maris <i>et al.</i> 2004b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OC2TT165R	Extracto de levadura, azúcares de zumo de caña, 200 gl ⁻¹	122	61	No consta	L-(+) 99.9%	Saitoh <i>et al.</i> 2005
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RWB876	Glucosa de lote simple, suplementada con vitaminas, 74 gl ⁻¹	61	82	No consta	L-(+) No consta	Liu <i>et al.</i> 2005
<i>Lactobacillus helveticus</i> GRL89	Extracto de levadura, lactosa de lote simple, 81 gl ⁻¹	75	92	3.2	L-(+) No consta	Kyla-Nikkila <i>et al.</i> 2000
<i>Lactobacillus</i> sp. NRRL B-30574	Extracto de levadura, glucosa de lote simple , 130 gl ⁻¹	103	79	No consta	L-(+) 100%	Eddington <i>et al.</i> 2004
<i>Rhizopus oryzae</i> ADM 34.31	glucosa de urea y de lote de elevación por aire de medio rico, 120 gl ⁻¹	109	89	1.3	L-(+) No consta	Liaw 2003

^e 10% de glucosa.
^f valores calculados según el promedio para el periodo de 24-h más productivo.

5

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

Plásmido o cepa	Características pertinentes	Fuentes
TG114	Δ focA-pflB::FRT, Δ adhE::FRT, Δ ackA::FRT, frdA:: <i>E. chrysanthemi</i> celY, Δ frdBC::FRT, lacA: <i>K. oxytoca</i> cas AB, Δ mgsA::FRT	Grabar, <i>et al.</i> 2006
TG117	TG114, Δ frdBC::FRT-cat-sacB-FRT	Este estudio
TG118	Δ focA-pflB::FRT, Δ adhE::FRT, Δ ackA::FRT, Δ frdBC, lacA: <i>K. oxytoca</i>	Este estudio

ES 2 573 980 T3

	<i>cas AB, ΔmgsA::FRT</i>	
TG119	TG118, <i>ΔackA::FRT-cat-sacB-FRT</i>	Este estudio
TG120	<i>ΔfocA-pflB::FRT, ΔadhE::FRT, ΔackA, ΔfrdBC, lacA:K. oxytoca cas AB, ΔmgsA::FRT</i>	Este estudio
TG121	TG120, <i>ΔlacZ-cynX (lacZ'-sacB-cat-cynX')</i>	Este estudio
TG122	<i>ΔfocA-pflB::FRT, ΔadhE::FRT, ΔackA, ΔfrdBC, ΔmgsA::FRT</i>	Este estudio
TG123	TG122, <i>ΔmgsA::FRT-cat-sacB-FRT</i>	Este estudio
TG124	<i>ΔfocA-pflB::FRT, ΔadhE::FRT, ΔackA, ΔfrdBC, ΔmgsA</i>	Este estudio
TG125	TG124, <i>ΔfocA-pflB:FRT-cat-sacB-FRT</i>	Este estudio
TG126	<i>ΔfocA-pflB, ΔadhE::FRT, ΔackA, ΔfrdBC, ΔmgsA</i>	Este estudio
TG127	TG126, <i>ΔadhE::FRT-cat-sacB-FRT</i>	Este estudio
TG128	<i>ΔfocA-pflB, ΔadhE, ΔackA, ΔfrdBC, ΔmgsA</i>	Este estudio
TG129	TG128, crecimiento mejorado a 39°C	Este estudio
TG130	TG129, crecimiento mejorado a 43°C	Este estudio
<u>Plásmidos</u>		
pKD46	<i>bla γ β exo</i> (recombinasa roja), replicón pSC101 dependiente de la temperatura	Datsenko and Wanner (2000)
pFT-A	<i>bla flp</i> replicón pSC101 dependiente de la temperatura	Posfai <i>et al.</i> (1997)
pELO4	<i>cat sacB</i>	
pLOI4151	FRT <i>cat sacB</i>	Este estudio
PLOI3956	' <i>lacZ' lacY lacA cynX'</i> TOPO clonado	Este estudio
PLOI3957	' <i>lacZ' sacB cat cynX'</i>	Este estudio
pLOI4411	' <i>frdA frdB frdC frdD'</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4412	' <i>ackA'</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4413	<i>ychE' adhE ychG</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4415	<i>focA-pflB</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4416	' <i>yccT mgsA' helD</i> TOPO clonado	Este estudio
pLOI4417	pLOI4411 <i>ΔfrdBC</i>	Este estudio
pLOI4418	pLOI4412 <i>ΔbackA</i>	Este estudio
pLOI4419	pLOI4413 <i>AadhE</i>	Este estudio
pLOI4421	pLOI4415 <i>ΔfocA-pflB</i>	Este estudio
pLOI4422	pLOI4416 <i>ΔmgsA</i>	Este estudio
<u>Cebadores</u>		
Cebador sentido para la amplificación de FRT- <i>cat-sacB</i>	tgtgctgcaaggcgattaag (SEC ID N°:9)	Este estudio
Cebador antisentido para la amplificación de FRT- <i>cat-sacB</i>	ttcgatcacggcagcatcat (SEC ID N°:10)	Este estudio
Cebador sentido para la amplificación de <i>cat-sacB</i> con sitio 5' <i>NheI</i>	ttagctagcatgtgacggaag (SEC ID N°:11)	Este estudio
Cebador antisentido para la amplificación de <i>cat-sacB</i> con sitio 5' <i>NheI</i> site	ccgctagcatcaaagggaaaa (SEC ID N°:12)	Este estudio
Cebador sentido para clonar <i>frdABCD</i>	ctggagtacagcgacgtgaagat (SEC ID N°:13)	Este estudio
Cebador antisentido para clonar <i>frdABCD</i>	cagaacgcgctcgtagctca (SEC ID N°:14)	Este estudio
Cebador sentido para clonar <i>ackA</i>	gaactgcggtagtcttactg (SEC ID N°:15)	Este estudio
Cebador antisentido para clonar <i>ackA</i>	gcgtcttgcgcgataaccag (SEC ID N°:16)	Este estudio
Cebador sentido para clonar <i>lacZ-cynX</i>	gaagtgaccagcgaatacct (SEC ID N°:17)	Este estudio
Cebador antisentido para clonar <i>lacZ-cynX</i>	ggtgatgccttcggtgatta (SEC ID N°:18)	Este estudio
Cebador sentido para clonar <i>mgsA</i>	gctattccaccgcagctca (SEC ID N°:19)	Este estudio
Cebador antisentido para clonar <i>mgsA</i>	ttatggaagaggcgctactgc (SEC ID N°:20)	Este estudio

ES 2 573 980 T3

Cebador sentido para clonar <i>focA-pflB</i>	agatcgccagcccgtgcaat (SEC ID N°:21)	Este estudio
Cebador antisentido para clonar <i>focA-pflB</i>	aaccgttggtgtccagacag (SEC ID N°:22)	Este estudio
Cebador sentido para clonar <i>adhE</i>	ccgctgtctgataactggtc (SEC ID N°:23)	Este estudio
Cebador antisentido para clonar <i>adhE</i>	gcataagcggatggtcactg (SEC ID N°:24)	Este estudio
Cebador sentido para delecionar <i>frdBC</i>	P-gtgggtgccaccatcgtaat (SEC ID N°:25)	Este estudio
Cebador antisentido para delecionar <i>frdBC</i>	P-cgccttctctcttattgg (SEC ID N°:26)	Este estudio
Cebador sentido para delecionar <i>ackA</i>	P-ctggagcgtgtgtattcactg (SEC ID N°:27)	Este estudio
Cebador antisentido para delecionar <i>ackA</i>	P-gttgagcgtctcgctgtgag (SEC ID N°:28)	Este estudio
<i>lacZ</i> cebador antisentido con sitio 5' <i>NheI</i>	acgctagctctgacaatggca (SEC ID N°:29)	Este estudio
cebador antisentido de <i>cynX</i> con sitio 5' <i>NheI</i>	acgctagcattgccgctgata (SEC ID N°:30)	Este estudio
Cebador sentido para delecionar <i>mgsA</i>	P-agcgttatctcgccgaccgt (SEC ID N°:31)	Este estudio
Cebador antisentido para delecionar <i>mgsA</i>	P-aagtgcgagctgctagttcc (SEC ID N°:32)	Este estudio
Cebador sentido para delecionar <i>focA-pflB</i>	P-gcagcaggacgttattactc (SEC ID N°:33)	Este estudio
Cebador antisentido para delecionar <i>focA-pflB</i>	P-gcctacattgcgtaggctatt (SEC ID N°:34)	Este estudio
Cebador sentido para delecionar <i>adhE</i>	P-gctgctccggctaaagctga (SEC ID N°:35)	Este estudio
Cebador antisentido para delecionar <i>adhE</i>	P-acgctctacgagtgctgtaag (SEC ID N°:36)	Este estudio

Tabla 12. Secuencia parcial de región de delecciones

Cepa / gen	Secuencia parcial^a	ADN extra (bp)
TG1 14 <i>frdABC</i>	<u>GCCAATAAGAAGGAGAAGGCCAATGGATCTGATAGATTGTTTTAAAAAATGTTTTTGG</u> <u>CTCTCGACAATTTCCAACAACATCCCTATATTTATCCCATCTAAAAGGCCTCTACCTTGA</u> <u>AAAGGCGAGGCTACCTGCTTGTFTTTTCGGGACAGGATCCTCTAGAGTCAACCTGCTTGTT</u> <u>ACTCGTGATCCCATTCACAAGGGCGAATTAATTCGCCCTTCTGTTCCGTTACCAACACTG</u> <u>AGCCGGACAGTAATGGAAAGCCAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCATACTT</u> <u>TCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGTTGGTTGCCAC</u> <u>CATCGTAATCCTGTT^b</u> (SEC ID N°: 37)	322
TG128 <i>frdABC</i>	GCGAATAAGAAGGAGAAGGCCG-GTGGTTGCCACCATCGTAATCCTGTT ^c (SEC ID N°:38)	0

TG114 <i>ackA</i>	CTCACAGCGAAGCGCTCAACTTTATCGTTAATACTATTCTGGCACAAAAACCAGAACTGT CTGCGCAGCTGACTGCTATCGGTACCCTATCGTACACGGCGCGGAAAAAGTATACCAGCT CCGTAGTGCATCGATGAGTCTGTTATTCAGGGTATCAAAGATGCAGCTTCTTTTGCACCGC TGCACAACCCGGCTCACCTGATCGGTATCGAAGAAGCTCTGAAATCTTTCCACAGCTGA AAGACAAAAACGTTGCTGTATTTGACACCCGGTCCACCAGACTATGCCGGAAGAGTCTT ACCTCTACGCCCTGCCTTACAACCTGTACAAAGAGCACGGCATCCGTGTTACGGCGCGC ACGGCACCAGCCACTTCTATGTAACCCAGGAAGCGGCAAAAATGCTGAACAAACCCGGTAG AAGAACTGAACATCATCACCTGCCACCTGGCCAACGGTGGTTCGGTTTCTGCTATCCGCA ACGGTAAATGCGTTGACACCTCTATGGGCCCTGACCCCGCTGGAAGGTCTGGTCATGGGTA CCCGTTCTGGTGATGGGGAGCTTGTGACAAATCGAAGTTCCCTATACTTTCTAGAGAATA GGAACCTCGGATCAATTCATCGGGCGCGGGAATCGAGCTCGGTACCCATCGATCCGGCG ATCATCTCCACCTGCACGACACCCCTGGGCAATGAGCGTTGACGCAATCAACAACTGCTG ACCAAAGAGTCTGGCCTGCTGGTCTGACCGAAGTGACCAGCGACTGCCGCTATGTTGAA GACAACCTACGCGACGAAAGAAGACGCGAAGCGCGCAATGGACGTTTACTGCCACCGCCTG GCGAAATACATCGGTGCCTACACTGCGCTGATGGATGGTCTGACGCTGTTGTATTC (SEC ID N°: 39)	94
TG128 <i>ackA</i>	CTCACAGCGAAGCGCTCAA-CCTGGACGCTGTTGTATTAC (SEC ID N°:40)	0
TG114 <i>mgsA</i>	ATGGAAGTACGACTCGCACTTTACCTGCGCGGAAACATATGTGTAGGCTGGAGCTGCTT CGAAGTTCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTC ATATGATATTCGATCCCGATTATCAGCGTTATCTCGCGGACCGTCTGA (SEC ID N° 41)	85
TG128 <i>mgsA</i>	ATGGAAGTACGACTCGCACTT-AGCGTTATCTCGCGGACCGTCTGA (SEC ID N°:42)	0
TG114 <i>focA-pflB</i>	ATAGCCTACGCAATGTAGGCTTAATGATTAGTCTGAGTTATATACGGGGCGTTTTTTTA ATGCCCCGCTTTACATATATTTGCATTAATAAAATAATTGTAATTATAAGGTTAAATATC GGTAATTTGTATTTAATAAATACGATCGATATGTTACTTTATTCGCCTGATGCTCCCTT TTAATTAAGTGTTTTAGCGGAGGATGCGGAAAAAATCAACTCATTTGTTAATTTTTAAA ATTTATTTTTATTTGGATAATCAAATATTTACTCCGATTTGCATAAAAACCATGCGAGT TACGGGCCCTA TAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCAAGTTCCCTATACTTTCTAGAGAATAG GAACTTCGGAATAGGAAC TAAGGAGGATATTCATATGAGAACAGCAGCAGGACGTTAT (SEC ID n°: 43)	85
TG128 <i>focA-pflB</i>	ATAGCCTACGCAATGTAGGC-GCAGCAGGACGTTAT (SEC ID N°:44)	0
TG114 <i>adhE</i>	AACGCACTCGTAGAGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCCTATACTTTCTAGAG AATAGGAAC TCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGCTGCTCCGGCTAAAGCT (SEC ID N° 45)	84
TG128 <i>adhE</i>	AACGCACTCGTAGAGCGT-GCTGCTCCGGCTAAAGCTGA (SEC ID N°:46)	0

^a Se muestran en negrita las secuencias parciales de las regiones 3' y 5' del/de los gen(es), en cursiva la cicatriz FRT y subrayada la región eliminada en la cepa TG128.
^b Esta región también contenía una secuencia parcial de un promotor de *Z. mobilis* así como una secuencia parcial del gen *celY* de *E. chrysanthemi*.
^c La barra indica la región de delección.

Cepa	Condiciones ^a	Lactato			Co-productos (mmol l ⁻¹)		
		mmol l ⁻¹	Rendim. (%) ^b	Pureza quiral (%)	Succinato	Acetato	Etanol
TG114	FMS, 37°C	1314 ± 48	98	>99.9	< 1	< 1	< 1
TG128	FMS, 37°C	1157 ± 37	96	>99.9	< 1	< 1	< 1
TG128	FMS, 39°C	865 ± 12	95	>99.9	< 1	< 1	< 1
TG128	FMS, 43°C			>99.9	< 1	< 1	< 1
TG129	FMS, 39°C	1063 ± 26	96	>99.9	< 1	< 1	< 1
TG129	FMS, 43°C	934 ± 18	94	>99.9	< 1	< 1	< 1
TG130	FMS, 43°C	1149 ± 49	97	>99.9	< 1	< 1	< 1

^a Sales minerales (NBS) con 12% (p/v) de glucosa, 1 mM de betaína, controlado a pH 7.0.
^b Rendimientos basados en azúcar metabolizado con un rendimiento teórico máximo de 2 moles de lactato por mol de hexosa (conversión a mismo peso).

5 [0103] Se debe entender que los ejemplos y formas de realización descritos aquí son sólo para uso ilustrativo y que varias modificaciones o cambios leves de los mismos serán sugeridos a personas expertas en la técnica.

Referencias

[0104]

Patente de EEUU Nº. 4,963,486

5 Solicitud de patente publicada de EEUU Nº. 20040005677

Solicitud de patente publicada de EEUU Nº. 20030003553

10 Solicitud de patente publicada de EEUU Nº. 20050112737

Solicitud de patente publicada de EEUU Nº. 20040029256

WO 99/14335

15 Adachi et al. (1998) "Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value" *J. Ferment. Bioeng.* 86:284-289.

20 Agrawal, A.K. (2003) "Advances in the production of poly(lactic acid) fibers. A review." *J. Macromolec. Science-Polymer Rev.*, 4:479-503.

Arntzen, C.E., Dale, B.E. (1999) *Biobased industrial products, priorities for research and commercialization*, National Academy Press, Washington, D.C.

25 Ausubel, F.M. et al. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Deidman, J.A. Smith and K. Struhl (eds.) (2005) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.

30 Axe, D.D. and J.E. Bailey (1995) "Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*" *Biotechnol. Bioeng.* 47:8-19.

35 Badia, J., Gimenez, R., Baldoma, L., Barnes, E., Fessner, W.D., Aguilar, J. (1991) "L-lyxose metabolism employs the L-rhamnose pathway in mutant-cells of *Escherichia coli*-adapted to grow on xylose" *J. Bacteriol.* 173:5144-5150.

40 Bianchi, M.M., Brambilla, L., Protani, F., Liu, C., Lievens, Porro, D. (2001) "Efficient homolactic fermentation by *Kluveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with heterologous LDH gene" *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5621-5625.

Causey, T.B. et al. (2004) "Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucosa to pyruvate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:2235-2240.

45 Chang, D.E. et al. (1999) "Homofermentative production of D-(-) or L-(+) lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1" *Appl Environ Microbiol* 65:1384-1389. Chotani, G. et al. (2000) "The commercial production of chemicals using pathway engineering" *Biochim. Biophys. Acta* 1543:434-455.

50 Datsenko, K.A., Wanner, B.L. (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-6645.

Datta, R. et al. (1995) "Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives" *FEMS Microbiol. Rev.* 16:221-231.

55 Demirci, A. and A.L. Pometto (1992) "Enhanced production of D-(-)-lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC9649" *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 11:23-28.

Dien, B.S. et al. (2001) "Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars" *J Ind. Microbiol Biotechnol.* 27:259-264.

60 Grabar, T.B. et al (2006) "Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in L(+) and D(-) lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*" *Biotechnology Letters*, in publication.

Hofvendahl, K., and Hahn-Hagerdal, B. (2000) "Factors affecting fermentative lactic acid production from renewable resources" *Enzy. Microbiol. Technol* 26:87-107.

65 Konings, W. N. (2002) "The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria" *Antonie van*

Leeuwenhoek 82:3-27.

Kyla-Nikkila, K. et al. (2000) "Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNR32 for production of pure L-(+)-lactic acid" *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3835-3841.

Lee, E.-C., Yu, K., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2001) "A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC ADN" *Genomics* 73: 56-65.

Maniatis, T. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory.

Martinez-Morales, F. et al. (1999) "Chromosomal integration of heterologous ADN in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons during construction" *J. Bacteriol.*, 181:7143-7148.

Michels, P. A. M. et al. (1979) "Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products" *FEMS Microbiol. Lett.* 5:357-364.

Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*, Cold Spring Harbor Press.

Moniruzzaman, M. et al. (1997) "Isolation and molecular characterization of high-performance cellobiose-fermenting spontaneous mutants of ethanologenic *Escherichia coli* K011 containing the *Klebsiella oxytoca* casAB operon" *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4633-4637.

Narayanan et al. (2004) "L-(+) lactic acid fermentation and its product polymerization," *Elect. J. Biotechnol.*, 7:167-179.

Ohara, H. et al. (2001) "Development of industrial production of high molecular weight poly-L-lactate from renewable resources" *Nippon Kagaku Kaishi* 6:323-331.

Ohta, K. et al. (1991) "Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production by chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II" *Appl Environ Microbiol.* 57:893-900.

Poolman, B. (2002) "Transporters and their roles in LAB cell physiology" *Antonie van Leeuwenhoek*, 82:147-164.

Porro, D. et al. (1999) "Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts" *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4211-4215.

Posfai, G., Koob, M.D., Kirkpatrick, H.A., Blattner, F.C. (1997) "Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: Isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome" *J. Bacteriol.* 179:4426-4428.

Purvis, J.E. et al. (2005) "Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress" *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3761-3769.

Saitoh, S. et al. (2005) "Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity" *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2789-2792.

Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press.

Shukla, V.B. et al. (2004) "Production of D-(-)-lactate from sucrose and molasses," *Biotechnol Lett.*, 26:689-693.
van Maris, A. J. A. et al. (2004a) "Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes" *Metabolic Engineering* 6:245-255.

van Maris, A. J. A. et al. (2004b) "Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export" *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5):2898-2905.

Warnecke, T. and R.T. Gill (2005) "Organic acid toxicity, tolerance, and production of *Escherichia coli* biorefining applications" *Microbial Cell Factories* 4:25.

Zhou S., Ingram L.O. (1999) "Engineering endoglucanase-secreting strains of ethanologenic *Klebsiella oxytoca*

ES 2 573 980 T3

P2" J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 22:600-607.Zhou, S. et al. (2003) "Production of optically pure D-lactic acid in mineral salt medium by metabolically engineered Escherichia coli W3110" Appl Environ Microbiol. 69:399-407.

5 Zhou, S. et al. (2003a) "Productions of optically pure D-lactic acid in mineral salt medium by metabolically engineered Escherichia coli D-(-)-lactate dehydrogenase gene (IdhA) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (IdhL) from *Pediococcus acidilactici*" Appl. Environ. Microbiol. 69:2237-2244.

10 Zhou, S., Yomano, L.P., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2005) "Fermentation of 10% (w/v) sugar to D-(-)-lactate by engineered Escherichia coli B" Biotechnol. Lett. 27:1891-1896.

10 Zhou, S., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., Grabar, T.B., Ingram, L.O. (2006) "Fermentation of 12% (w/v) glucosa to 1.2 M lactate by Escherichia coli B strain SZ194 using mineral salts medium" Biotechnol.Lett. In Press.

15 Zhu, J. and Shimizu, K. (2004) "The effect of pfl gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by Escherichia coli" Appl Microbiol and Biotechnol. 64:367-375.

Listado de secuencias

[0105]

20

<110> university of Florida Research Foundation, Inc.

<120> materiales y métodos para la producción eficaz de ácido láctico

25

<130> EP15132-HE/vw

<160> 46

30

<170> versión de PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 65

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> cebador sentido para delección de frdBC

<400> 1

atgggctgaga tgaaaaacct gaaaattgag gtgggtgcgct ataacgtgta ggctggagct 60

40

gcttc 65

<210> 2

<211> 65

<212> ADN

<213> Artificial

45

<220>

<223> cebador antisentido para delección de frdBC

50

<400> 2

ttaccagtac agggcaacaa acaggattac gatgggtggca accaccatat gaatattcctc 60

cttag 65

55

<210> 3

<211> 65

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 573 980 T3

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

5 <400> 3

atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

<210> 4
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial

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

15 <400> 4

ttaagcggat tttttcgctt ttttctcagc ttttagccgga gcagccatat gaatatacctc 60
 cttag 65

<210> 5
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

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

25 <400> 5

gataaggcgg aagcagccaa taagaaggag aaggcgaatg gctgagtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

30

<210> 6
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial

35

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

40 <400> 6

ccagaatacc ggttcgtcag aacgctttgg atttgatta atcatcatat gaatatacctc 60
 cttag 65

<210> 7
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>

<223> cebador sentido para delección de mgsA

50 <400> 7

ES 2 573 980 T3

	atgtacatta tggaactgac gactcgcact ttacctgcgc ggaacatat gtgtaggctg	60
	gagctgcttc	70
5	<210> 8 <211> 70 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador antisentido para delección de mgsA	
	<400>8	
	ttacttcaga cgggccgca gataacgctg ataatcgggg atcagaatat catatgaata	60
	tcctccttag	70
15	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador sentido para amplificación de FRT-cat-sacB	
	<400> 9 Tgtgctgcaa ggcgattaag 20	
25	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador antisentido para amplificación de FRT-cat-sacB	
	<400> 10 Ttcgatcacg gcacgatcat 20	
35	<210> 11 <211> 21 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador sentido para amplificación de cat-sacB con sitio de NheI 5'	
45	<400> 11 Tgtgacggaa de ttagctagca g 21	
50	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador antisentido para amplificación de cat-sacB con sitio de NheI 5'	
	<400> 12 Ccgctagcat caaaggga a 21	

<210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador sentido para clonación de frdABCD
 <400> 13
 10 gcgacgtgaa de ctggagtaca gat 23
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador antisentido para clonación de frdABCD
 20 <400> 14
 Cagaacgcgc tcgtagctca 20
 <210> 15
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sentido para clonación de ackA
 30 <400> 15
 Gaactgcggt agttcttcac tg 22
 <210> 16
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador antisentido para clonación de ackA
 40 <400> 16
 Gcgtcttgcg cgataaccag 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> cebador sentido para clonación de lacZ-cynx
 50 <400> 17
 Gaagtgacca gcgaatacct 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> cebador antisentido para clonación de lacZ-cynX
 60 <400> 18
 65 Ggtgatgcct tcggtgatta 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador sentido para clonación de mgsA
 <400> 19
 10 Gctattccac cgcagtctca 20
 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador antisentido para clonación de mgsA
 20 <400> 20
 Ttatggaaga ggcgctactg c 21
 <210> 21
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sentido para clonación de focA-pflB
 30 <400> 21
 Agatcgccag ccgctgcaat 20
 <210> 22
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador antisentido para clonación de focA-pflB
 40 <400> 22
 Aaccgttggt gtccagacag 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador sentido para clonación de adhE
 <400> 23
 55 Ccgctgtctg ataactggtc 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador antisentido para clonación de adhE
 <400> 24
 65 Gcataagcgg atggtcactg 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador sentido para delección de frdBC
 <400> 25
 10 Gtgggtgccca ccatcgtaat 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador antisentido para delección de frdBC
 20 <400> 26
 Cgccttctcc ttctattgg 20
 <210> 27
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sentido para delección de ackA
 30 <400> 27
 Ctgagcgctg ttgtattcac tg 22
 <210> 28
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador antisentido para delección de ackA
 40 <400> 28
 Gttgagcgct tcgctgtgag 20
 <210> 29
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> lacZ antisentido con sitio de NheI 5'
 50 <400> 29
 Acgctagctc tgacaatggc a 21
 <210> 30
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cynX antisentido con sitio de NheI 5'
 60 <400> 30
 65 Acgctagcat tgccgctgat a 21

ES 2 573 980 T3

<210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador sentido para delección de mgsA
 <400> 31
 10 Agcgttatct cgcgaccgt 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador antisentido para delección de mgsA
 <400> 32
 20 Aagtgcgagt cgtcagtcc 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador sentido para delección de focA-pflB
 30 <400> 33
 Gcagcaggac gttattactc 20
 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador antisentido para delección de focA-pflB
 40 <400> 34
 Gcctacattg cgtaggctat t 21
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> cebador sentido para delección de adhE
 <400> 35
 50 Gctgctccgg ctaaagctga 20
 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> cebador antisentido para delección de adhE
 <400> 36
 60 Acgctctacg agtgcgtaa g 21
 65

ES 2 573 980 T3

<210> 37
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 5
 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(375)
 <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo antes de la eliminación de la cicatriz de FRT
 10
 <400> 37

 gccaaataaga aggagaaggc gaatggatct gatagattgt ttttaaaaaa ttgtttttgg 60
 ctctcgacaa tttccaacaa catccctata tttatcccat ctaaaaggcc tctaccttga 120
 aaaggcgagg ctacctgctt gtttttcggg acaggatcct ctagagtcaa cctgcttggt 180
 actcgtgatc ccattcaciaa gggcgaatta attcggcctt ctgttccggtt accaacactg 240
 agccggacag taatgggaaa gccaaagtga ggctggagct gcttcgaagt tcctatactt 300
 tctagagaat aggaacttcg gaataggaac taaggaggat attcatatgg tggttgccac 360
 catcgtaatc ctggtt 375

 <210> 38
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 15
 <220>
 <221> misc feature
 <222> (21)..(22)
 <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la eliminación de la cicatriz de FRT;
 sitio de escisión entre nucleótidos 21 y 22
 20
 <400> 38
 Gccaataaga aggagaaggc ggtggtgccc accatcgtaa tctctgtt 47

 <210> 39
 <211> 900
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 30
 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(900)
 <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo antes de la eliminación de la cicatriz de FRT
 35
 <400> 39

ES 2 573 980 T3

ctcacagcga agcgctcaac tttatcgta atactattct ggcacaaaa ccagaactgt 60
ctgcgagct gactgctatc ggtcaccgta tcgtacacgg cggcgaaaag tataccagct 120
ccgtagtgat cgatgagtct gttattcagg gtatcaaaga tgcagcttct tttgcaccgc 180
tgcacaacc ggctcacctg atcggtatcg aagaagctct gaaatcttcc ccacagctga 240
aagacaaaa cgttgctgta tttgacaccg cgttccacca gactatgccg gaagagtctt 300
acctctacgc cctgccttac aacctgtaca aagagcacgg catccgctgt tacggcgcgc 360
acggcaccag ccacttctat gtaaccacgg aagcggcaaa aatgctgaac aaaccggtag 420
aagaactgaa catcatcacc tgccacctgg gcaacggtgg ttccgtttct gctatccgca 480
acggtaaatg cgttgacacc tctatgggcc tgaccccgct ggaaggctctg gtcatgggta 540
cccgttctgg tgatggggag cttgtcgaca attcgaagt cctatacttt ctagagaata 600
ggaacttcgg atcaattcat cgggcgcggg aattcgagct cggtaacctat cgatccggcg 660
atcatcttcc acctgcacga caccctgggc atgagcgttg acgcaatcaa caaactgctg 720
accaaagagt ctggcctgct gggctctgacc gaagtgacca gcgactgccg ctatgttgaa 780
gacaactacg cgacgaaaga agacgcgaag cgcgcaatgg acgtttactg ccaccgctg 840

gcgaaataca tcggtgccta cactgcgctg atggatggtc gtctggacgc tgttgattc 900

5 <210> 40
<211> 37
<212> ADN
<213> Escherichia coli

10 <220>
<221> misc feature
<222> (19)..(20)
<223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la eliminación de la cicatriz de FRT; sitio de escisión entre nucleótidos 19 y 20

15 <400> 40
Ctcacagcga agcgctcaac tggacgctgt tgtattc 37

20 <210> 41
<211> 170
<212> ADN
<213> Escherichia coli

25 <220>
<221> misc feature
<222> (1)..(170)
<223> secuencia parcial del genoma del microorganismo antes de la eliminación de la cicatriz de FRT

<400> 41

ES 2 573 980 T3

atggaactga cgactcgcac tttacctgcg cggaacata tgtgtaggct ggagctgctt 60
 cgaagttcct atactttcta gagaatagga acttcggaat aggaactaag gaggatattc 120
 atatgatatt ctgatccccg attatcagcg ttatctcgcg gaccgtctga 170

5 <210> 42
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

10 <220>
 <221> misc feature
 <222> (22)..(23)
 <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la eliminación de la cicatriz de FRT; sitio de escisión entre nucleótidos 22 y 23

15 <400> 42
 Atggaactga cgactcgcac ttacggttat ctgcggacc gtctga 46

20 <210> 43
 <211> 418
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

25 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(418)
 <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo antes de la eliminación de la cicatriz de FRT

<400> 43

atagcctacg caatgtaggc ttaatgatta gtctgagtta tattacgggg cgttttttta 60
 atgccccgct ttacatatat ttgcattaat aaaataattg taattataag gttaaataatc 120
 ggtaatttgt atttaataaa tacgatcgat attgttactt tattcgctg atgctccctt 180
 ttaattaact gtttagcgg aggatgcgga aaaaattcaa ctcatgtgtt aatttttaaa 240
 atttattttt atttgataa tcaaatattt actccgtatt tgcataaaaa ccatgagcag 300
 tacgggccta taagtgtagg ctggagctgc ttcgaagttc ctatactttc tagagaatag 360
 gaacttcgga ataggaacta aggaggatat tcatatgaga acagcagcag gacgttat 418

30 <210> 44
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

35 <220>
 <221> misc feature
 <222> (20)..(21)
 <223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la eliminación de la cicatriz de FRT; sitio de escisión entre nucleótidos 20 y 21

40 <400> 44
 Atagcctacg caatgtaggc gcagcaggac gttat 35

45 <210> 45
 <211> 120

ES 2 573 980 T3

<212> ADN
<213> Escherichia coli

5 <220>
<221> misc feature
<222> (1)..(120)
<223> secuencia parcial del genoma del microorganismo antes de la eliminación de la cicatriz de FRT

10 <400> 45

aacgcactcg tagagcgtgt gtaggctgga gctgcttcga agttcctata ctttctagag 60
aataggaact tcggaatagg aactaaggag gatattcata tggctgctcc ggctaaagct 120

15 <210> 46
<211> 36
<212> ADN
<213> Escherichia coli

20 <220>
<221> misc feature
<222> (18)..(19)
<223> secuencia parcial del genoma del microorganismo después de la eliminación de la cicatriz de FRT; sitio de escisión entre nucleótidos 18 y 19

25 <400> 46
Aacgcactcg tagagcgtgc tgctccgct aaagct 36

REIVINDICACIONES

1. Ácido láctico genéticamente modificado que produce *E. coli*, que comprende las modificaciones siguientes:
 - a) inactivación o delección del gen de acetato-cinasa (*ackA*);
 - b) inactivación o delección de un gen de fumarato reductasa (*frdBC*);
 - c) inactivación o delección del gen de piruvato-formato liasa (*pflB*);
 - d) inactivación o delección del gen de alcohol deshidrogenasa (*adhE*); y
 - e) inactivación o delección del gen de metilglioal sintasa (*mgsA*).
2. Composición que comprende un medio de cultivo y una cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 1.
3. Método para producir ácido láctico quiralmente puro que comprende cultivar una cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 1 bajo condiciones que permiten la producción de ácido láctico.
4. Método para producir ácido D-(-)-láctico que comprende cultivar una cepa de *E. coli* genéticamente modificada según la reivindicación 1 bajo condiciones que permiten la producción de ácido D-(-)-láctico.

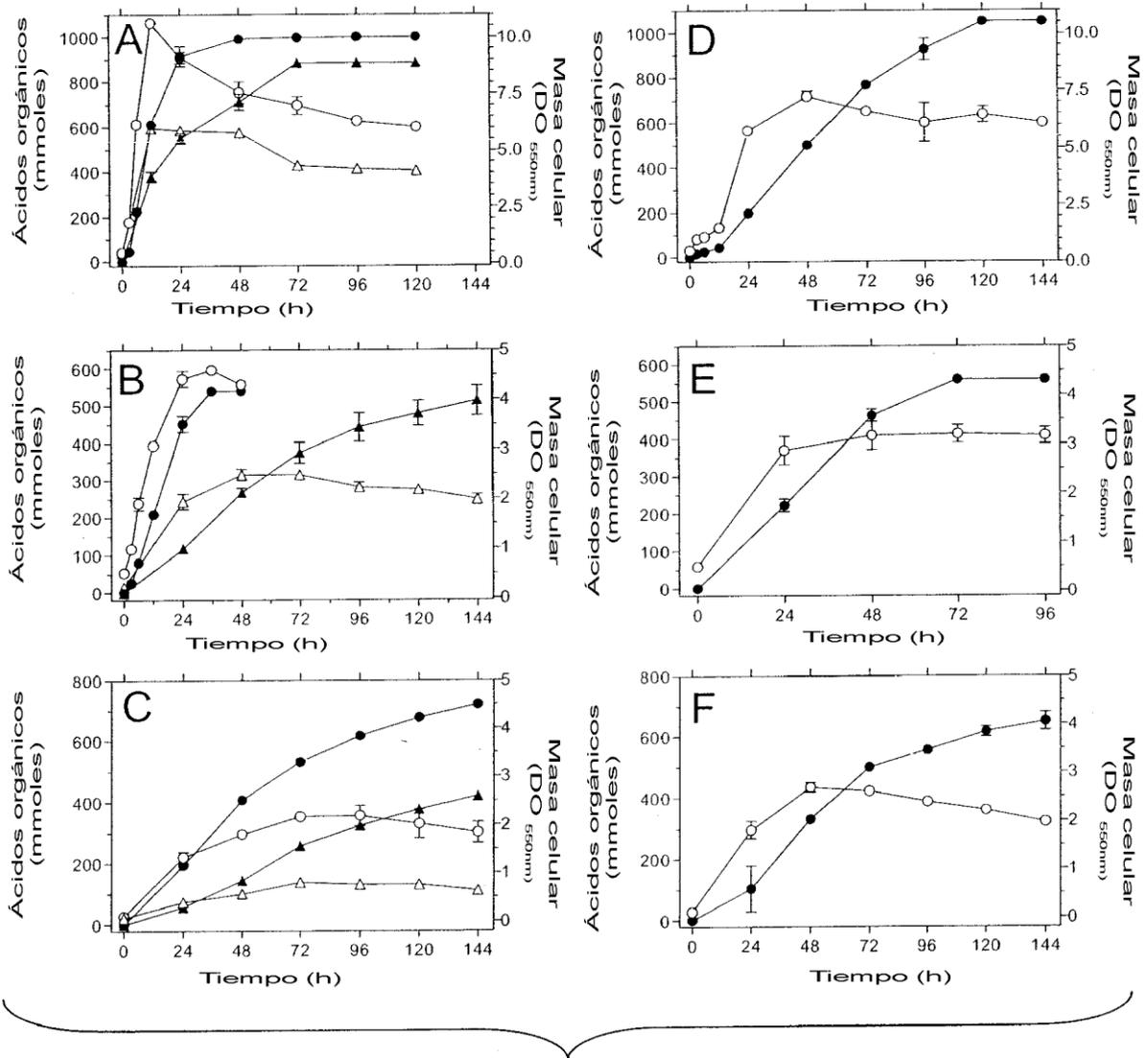
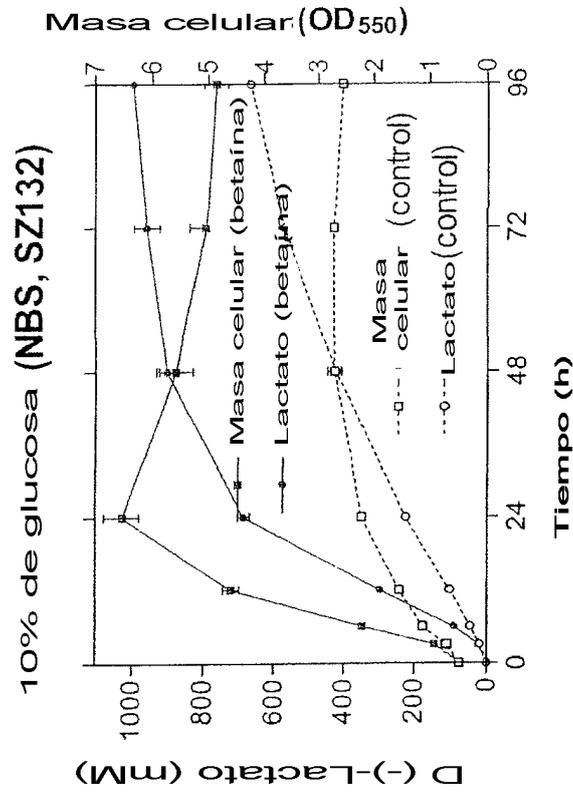


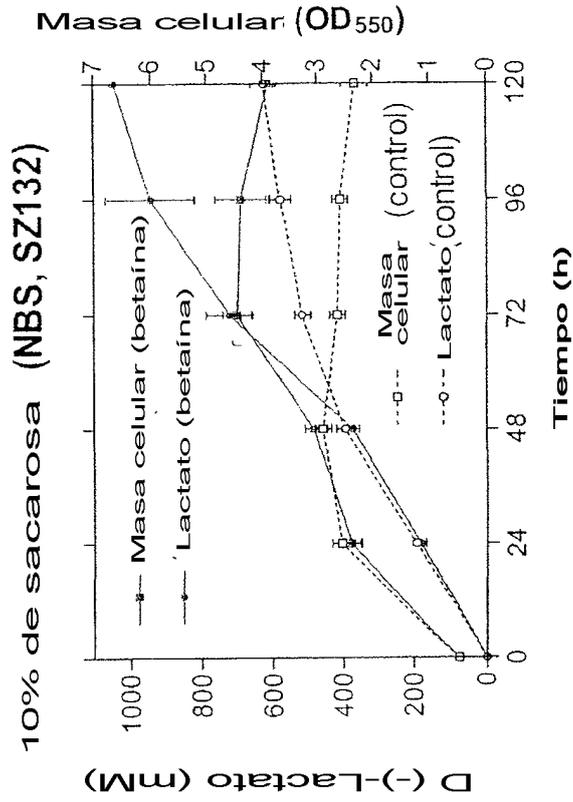
FIG. 1

FIG. 2A



+ y - 1 mm betaina

FIG. 2B



+ y - 1 mm betaina

FIG. 2D

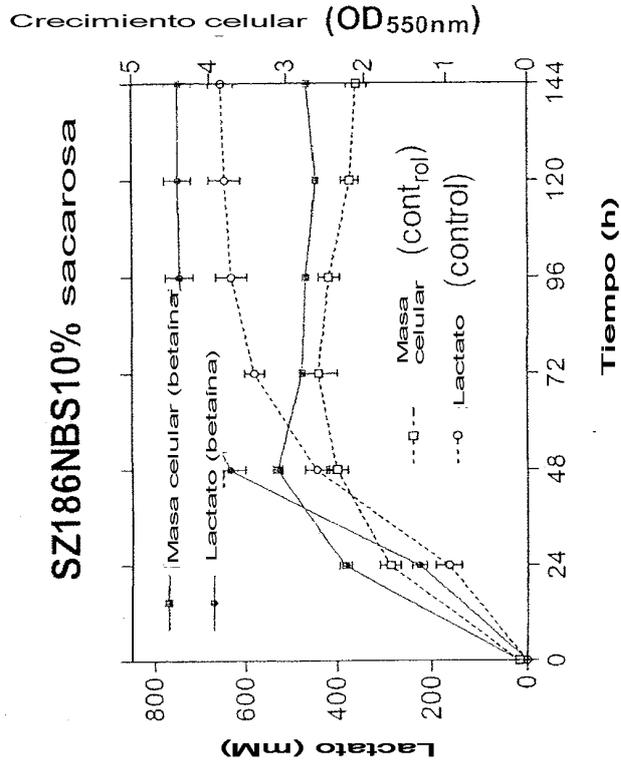
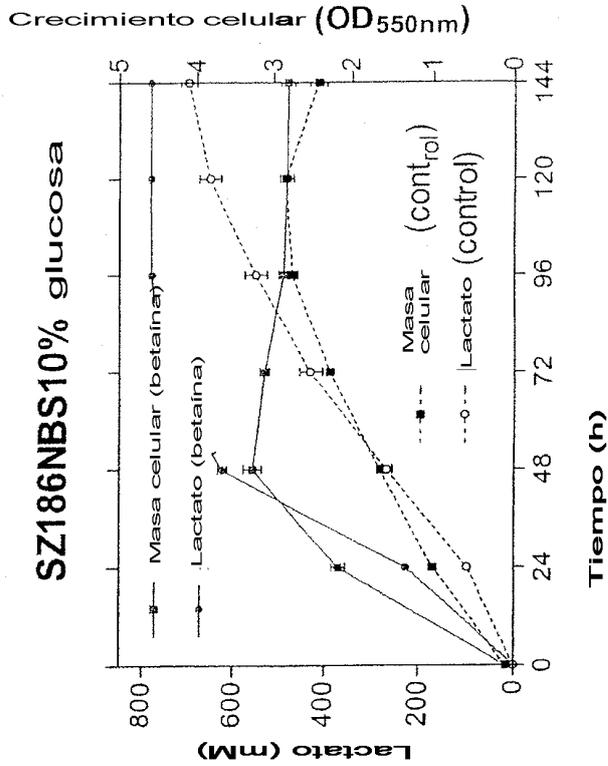


FIG. 2C



+ y -1 mM betaina

+ y -1 mM betaina

SZ186 es cepa mejorada, productos más limpios, mayores rendimientos

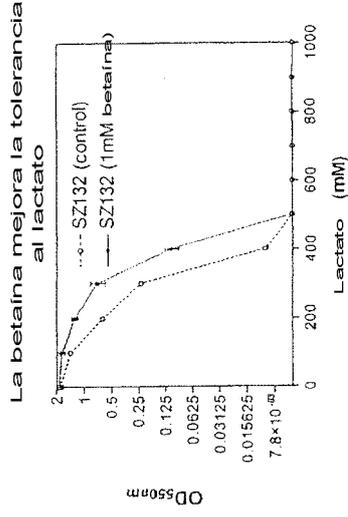


FIG. 3A

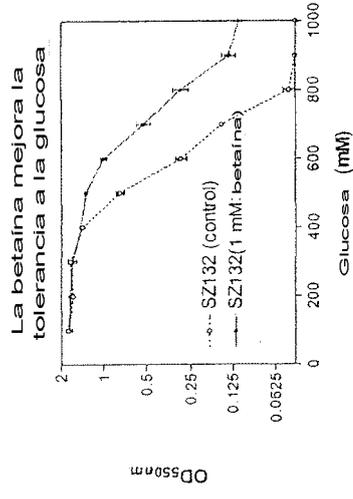


FIG. 3B

La betaina aumentó la tolerancia al ácido y la tolerancia al azúcar

FIG. 4A

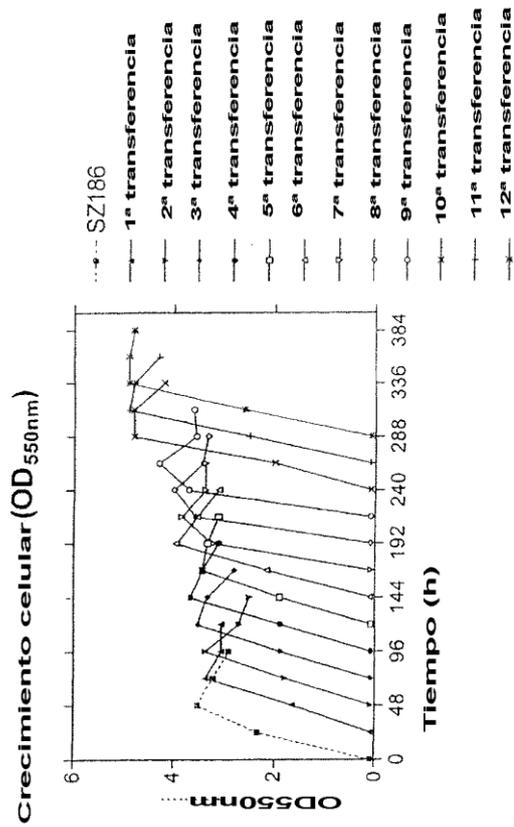
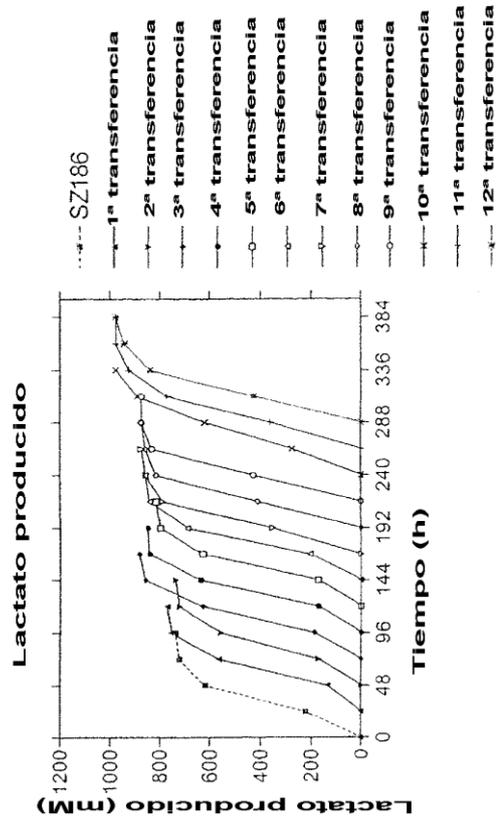
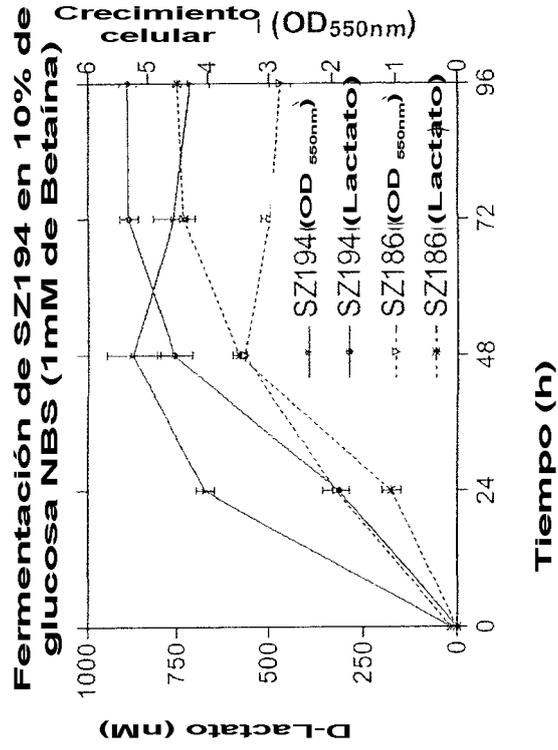


FIG. 4B



Aclimatación de SZ186 a medio mineral, cepa resultante SZ194

FIG. 5A



SZ194 es más rápida que SZ186

FIG. 5B

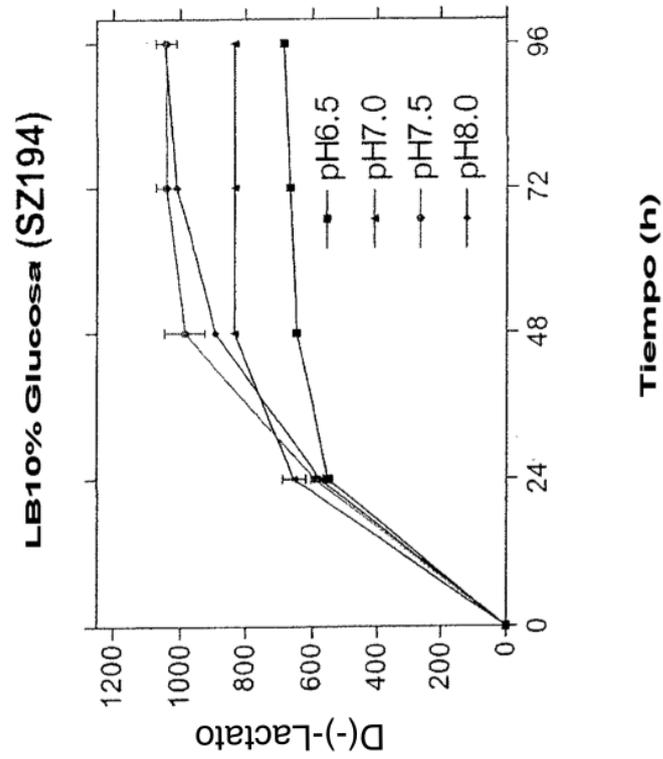
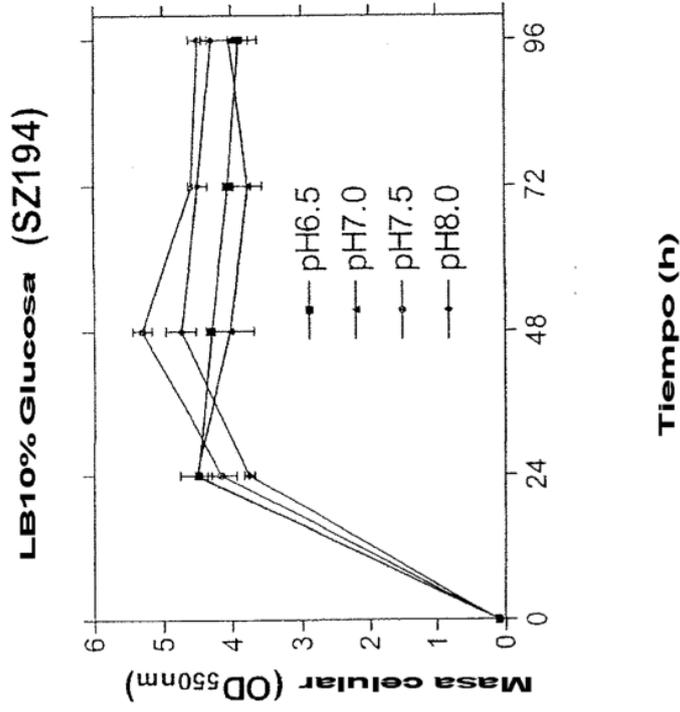


FIG. 5C



pH 7.5 y 8.0 son mejores que pH 6.5 y pH 6.0

FIG. 5E

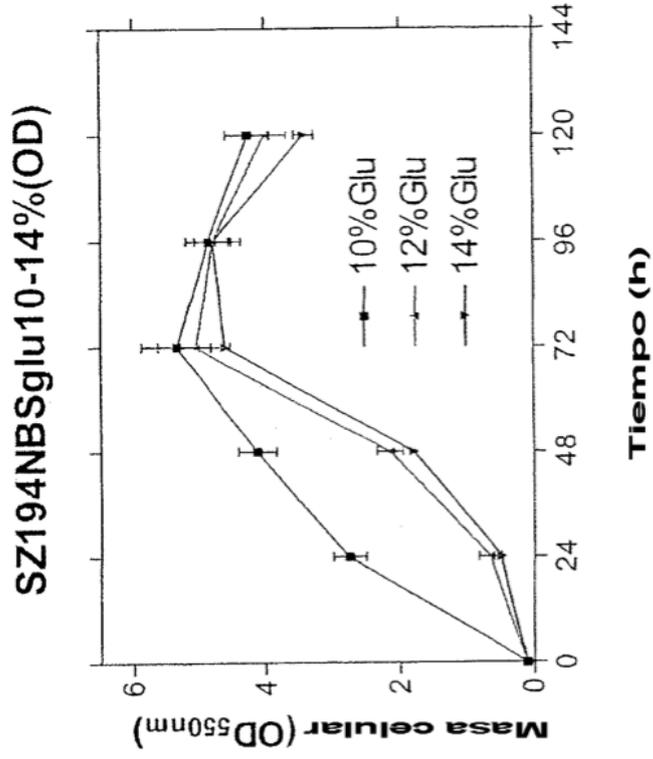
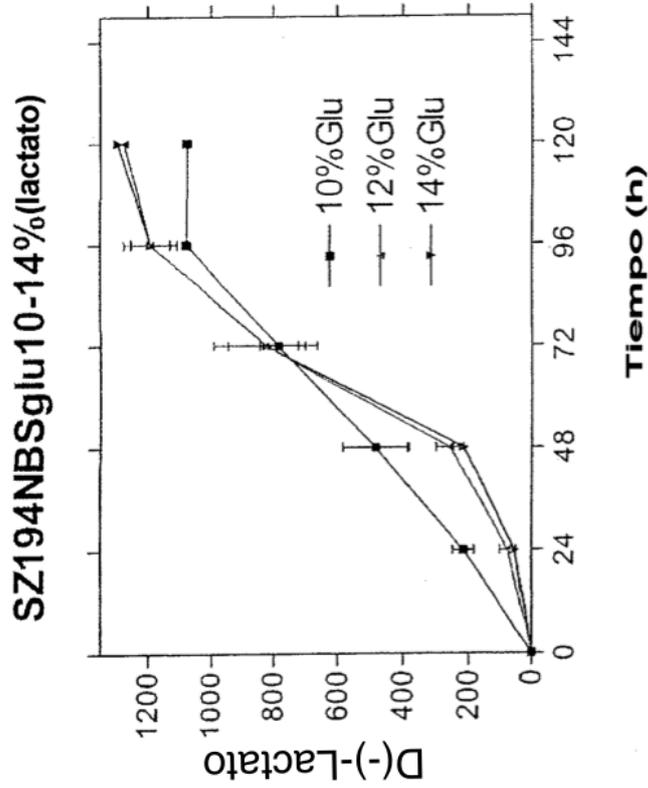


FIG. 5D



Por encima de 10% de azúcar, los cultivos crecen lentamente

FIG. 5G

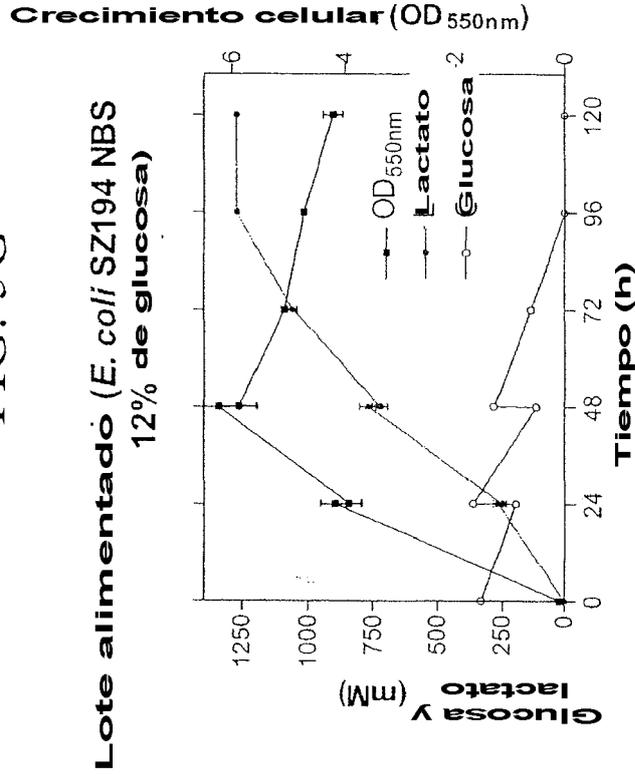
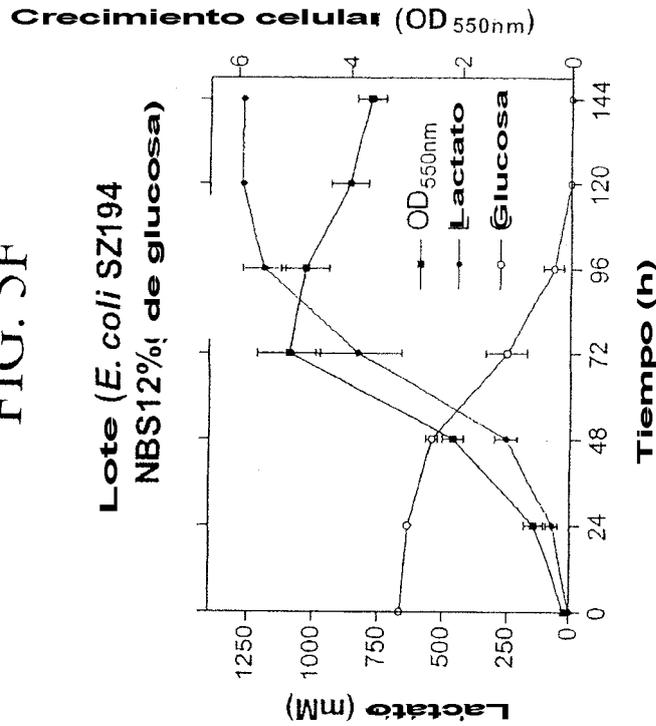


FIG. 5F



El lote alimentado ayudó a mejorar los índices, >1 M de lactato en caldo tras 72-96 h.