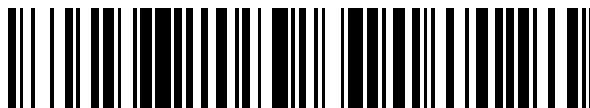


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 761**

21 Número de solicitud: 201530174

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.08.2016

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

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

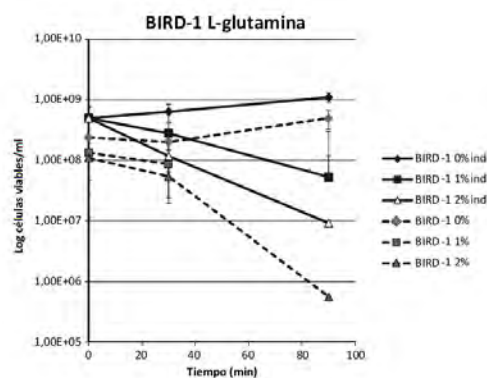
74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Célula microbiana modificada genéticamente con tolerancia mejorada frente a alcoholes**

57 Resumen:

Célula microbiana modificada genéticamente con tolerancia mejorada frente a alcoholes. La invención se refiere a una célula microbiana genéticamente modificada para producir glutamina de manera endógena mediante la sobreexpresión de una o más enzimas con actividad glutamina sintetasa. Los autores han observado que la presencia de glutamina en el medio mejora la tolerancia de las células bacterianas a los alcoholes.



DESCRIPCIÓN

Célula microbiana modificada genéticamente con tolerancia mejorada frente a alcoholes

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de los procesos de producción industrial de alcoholes. En particular, la invención se refiere a una célula microbiana genéticamente modificada para producir glutamina de manera endógena mediante la sobreexpresión de una o más enzimas con actividad glutamina sintetasa. Los autores han observado que la presencia de glutamina en el medio mejora la tolerancia de las células bacterianas a los alcoholes.

La presente invención también se relaciona con una construcción génica que comprende las secuencias polinucleotídicas que codifican dichas enzimas con actividad glutamina sintetasa, así como a un vector de expresión que comprende dicha secuencias polinucleotídicas o dicha construcción génica.

Asimismo, la invención se refiere a un método para producir células bacterianas con tolerancia mejorada a alcoholes mediante transformación con una construcción génica o un vector de expresión como los anteriormente mencionados.

Además, la invención también se refiere a una composición microbiológica para producir alcoholes basada en la célula bacteriana genéticamente modificada de la invención.

La invención se relaciona con el uso de las células bacterianas de la invención o de la composición microbiológica de la invención para mejorar el rendimiento en la producción de alcoholes, y muy especialmente de butanol, y en particular, a un procedimiento para producir alcoholes a partir de dichas células o de dicha composición microbiológica.

Por último, la invención se refiere a un procedimiento para aumentar la producción de alcoholes en procesos fermentativos basado en la incubación de las células productoras de alcoholes en un medio con azúcares fermentables suplementado con glutamina o un precursor de la misma.

35

Antecedentes de la invención

La producción de bioalcoholes en procesos industriales de degradación de biomasa se está convirtiendo en una alternativa prometedora para producir combustibles de sustitución de los tradicionales combustibles de origen fósil como la gasolina. Por ejemplo, el butanol (C₄H₉OH) se perfila como uno de los alcoholes más prometedores. El butanol es además, un producto interesante en la industria química como un precursor de pinturas, y se usa en la fabricación de polímeros y plásticos. Debido a su naturaleza de alcohol de cuatro carbonos, tiene un mayor contenido energético que otros alcoholes como por ejemplo, el etanol. Actualmente, el butanol se presenta como combustible alternativo a la gasolina por su mayor contenido energético un 40 % superior al del etanol y por ser menos corrosivo para los motores.

El desarrollo de un proceso económico de conversión de un producto de poco valor como la biomasa hacia otro tipo de productos de alto valor añadido como, por ejemplo, los alcoholes vía transformación química o fermentación, requiere la optimización de varias etapas clave. En especial, una de gran importancia es la de la transformación de los azúcares obtenidos por la degradación de la biomasa hacia alcoholes. Dicha transformación química puede en principio llevarse a cabo de diferentes formas aunque la más habitual es por fermentación con microorganismos. Algunos de los microorganismos que se han usado hasta la fecha para la producción de alcoholes a partir de biomasa pertenecen a diferentes géneros como, por ejemplo, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Geobacillus*, *Zymomonas*, *Pseudomonas* o *Saccharomyces*.

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

Por un lado, se han llevado a cabo muchos intentos de mejorar la eficiencia de los procesos de producción de alcoholes mediante estrategias dirigidas a aumentar la producción de alcohol por parte de los microorganismos. Entre estas cabe mencionar aquellas dirigidas a la selección y aislamiento de nuevas cepas productoras de alcoholes [Liu, Xiao-Bo et al. Weishengwuxue Tongbao, 2012, 39(11): 1629-1635] o aquellas dirigidas a inducir mutaciones aleatorias en microorganismos ya productores de alcohol para aislar mutantes

que den una mayor producción [Zhang, Lili et al. *Zhongguo Niangzao*, 2013, 32(5):129-133]. No obstante, el método más efectivo de aumentar la producción es mediante la manipulación genética de los microorganismos para introducirles genes involucrados en las vías sintéticas de diferentes alcoholes o incluso operones que comprenden los genes de rutas sintéticas completas (WO2009122192, WO2009120806, WO2008137406, WO2008137403, WO2008137402).

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

La búsqueda y aislamiento de nuevos microorganismos con mayor tolerancia a alcoholes es una constante [Ting, Cindy NG Wei et al *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 168(6): 1672-1680].

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

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

Algunas estrategias han desarrollado ingeniería de factores de transcripción para obtener el fenotipo deseado de una cepa super tolerante. Estos factores de transcripción se generan mediante técnicas clásicas como la reacción en cadena de la polimerasa propensa a errores. Lee y colaboradores [Lee, Ju-Young et al *Biotechnology and Bioengineering* (2011),

108(4): 742-749] crearon librerías de factores de transcripción artificiales (ATFs) fusionados a la proteína receptora de AMP cíclico con el objetivo de manipular el perfil transcripcional y poder ligarlo a un fenotipo de tolerancia. Los autores obtuvieron una tolerancia aumentada del 1.5 % (v/v) de butanol en *E. coli* y caracterizaron algunos de los genes ligados a dicha tolerancia como, por ejemplo, *sdhCDAB*, *flu*, *ybgD*, *yglpC*.

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

Ahora, los autores de la presente invención han desarrollado una nueva estrategia para mejorar la tolerancia de células microbianas y, por tanto, el rendimiento en la producción de alcoholes y, de manera especial en la producción de butanol. Esta estrategia se basa en el descubrimiento de que la presencia de glutamina ya sea de origen endógeno (producida por los propios microorganismos productores de alcoholes) o exógeno (añadida directamente al medio) tiene un efecto positivo en la tolerancia a alcoholes cuando está presente en el medio de producción. Los inventores han observado que la adición de glutamina o sus precursores al medio de producción proporciona una mejora en la tolerancia de las células frente a los alcoholes. Asimismo, los inventores han desarrollado células microbianas modificadas genéticamente para sobreexpresar glutaminas sintetasas que poseen una tolerancia mejorada frente a alcoholes y, en particular, frente a butanol.

Objeto de la invención

Por tanto, es el objeto principal de la presente invención, una célula microbiana genéticamente modificada para producir glutamina de manera endógena caracterizada porque dicha célula ha sido genéticamente modificada para sobreexpresar el producto

codificado por uno o más genes de enzimas con actividad glutamina sintetasa. En adelante nos referiremos a dicha célula microbiana como célula microbiana de la invención o sencillamente célula de la invención.

5 Otro objeto adicional de la invención es una construcción génica que comprende una o más
secuencias polinucleotídicas que codifican una o más enzimas con actividad glutamina
sintetasa operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la expresión
de proteínas en sistemas de expresión. En adelante nos referiremos a esta construcción
génica como construcción génica de la invención o sencillamente como construcción de la
10 invención.

Es también un objeto de la invención un vector de expresión que comprende la o las
secuencias polinucleotídicas que codifican la o las enzimas con actividad glutamina
sintetasa o que comprende la construcción génica de la invención. En adelante nos
15 referiremos a este objeto como el vector de expresión de la invención o sencillamente como
el vector de la invención.

Asimismo, es objeto de la invención un método para producir células microbianas con
tolerancia mejorada a alcoholes que comprende:

- 20
- a) Introducir en una célula huésped microbiana la construcción génica de la invención o el vector de expresión de la invención,
 - b) Aislar las células transformadas en la anterior etapa al incorporar la construcción génica de la invención o el vector de expresión de la invención.

25 Otro objeto relevante de la invención es una composición microbiológica para mejorar la
producción de alcoholes que comprende células microbianas de la invención y
opcionalmente al menos un elemento adicional que favorezca la producción de alcoholes.

30 Otro objeto adicional, es el uso de una célula de acuerdo con la invención o una
composición de acuerdo con la invención para mejorar el rendimiento en la producción de
alcoholes.

Un objeto relacionado con éste último, es un procedimiento para producir alcoholes que
35 comprende:

- a) incubar la célula de la invención o la composición microbiológica de la invención, en un medio con azúcares fermentables,
- b) recuperar los alcoholes producidos en la anterior etapa.

5

Finalmente, es un objeto de la invención un procedimiento para aumentar la producción de alcoholes en procesos fermentativos que comprende:

- a) Incubar una célula microbiana productora de alcoholes en un medio con azúcares fermentables suplementado con glutamina o un precursor de la glutamina,
- b) Recuperar los alcoholes producidos en la etapa a)

10

Breve descripción de las figuras

15 **Figura 1:** Cinéticas de muerte tras exposición repentina a diferentes concentraciones de butanol. En la figura 1A se muestra la supervivencia que presenta *Pseudomonas putida* BIRD-1 con y sin inducción de L-glutamina. En la figura 1B se muestra el mismo experimento para *Pseudomonas putida* KT2440 con y sin inducción de L-glutamina en el medio de cultivo.

20

Figura 2: representación esquemática del vector PSEVA438 utilizado para transformar células huésped microbianas para sobreexpresar glutamina sintasas/sintetasas.

Figura 3: Efecto de la L-glutamina sobre mutantes de las bombas MexEF y TtgABC

25

Figura 4: Cinéticas de muerte de *Pseudomonas putida* BIRD-1 mutadas en algunas de las bombas de extrusión, concretamente MexEF (PP_3425 figura 4A y PP_3426 figura 4B) OprN (PP_3427 figura 4C) y TtgABC (PP_1385, TtgB figura 4D y PP_1386, TtgA figura 4E) tras exposición repentina a un choque de 2% de butanol en presencia y ausencia de glutamina en el medio.

30

Descripción detallada de la invención

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

35

5 “**Célula microbiana**”: se refiere a cualquier microorganismo procariota o eucariota susceptible de ser manipulado genéticamente para producir glutamina de manera endógena. Los microorganismos procariota se refieren a células bacterianas y los microorganismos eucariotas se refieren generalmente a células fúngicas, como mohos o levaduras. En el contexto de la invención, las células microbianas son preferentemente productoras de alcoholes, bien de manera natural o de manera adquirida por manipulación genética. De manera preferente las células microbianas son productoras de butanol.

10 “**Célula bacteriana**”: se refiere a cualquier célula procariota gram positiva o gram negativa que pueda ser manipulada genéticamente para producir glutamina de manera endógena. En el contexto de la invención, preferiblemente las células bacterianas son productoras de butanol bien de manera natural o de manera adquirida por manipulación genética. De manera preferente las células bacterianas son productoras de butanol.

15

“**Célula genéticamente modificada**”: célula que ha sido manipulada genéticamente para producir por expresión homóloga o heteróloga el producto codificado por un gen. En particular en el contexto de la invención se refiere a una célula que ha sido manipulada genéticamente para producir por expresión homóloga o heteróloga una o más enzimas con actividad glutamina sintasa y/o sintetasa.

20

“**Glutamina**”: se refiere indistintamente a la forma L-glutamina o D-glutamina.

25 “**Sobreexpresión**”: de manera general se refiere a la expresión de una determinada proteína o enzima por parte de una célula por encima de los niveles normales y/o basales de la misma. En el contexto de la presente invención se refiere a la expresión por parte de las células genéticamente modificadas de las enzimas con actividad glutamina sintetasa por encima de los niveles normales y/o basales.

25

30 “**Enzimas con actividad glutamina sintetasa**”: hacen referencia a todas aquellas enzimas o proteínas que tengan capacidad de producir glutamina a partir de glutamato con consumo de ATP en la reacción (sintetasa).

30

“**Grado de homología**”: se refiere a la correspondencia de secuencia que se da entre una determinada secuencia polinucleotídica con otra. El término grado de homología implica que la longitud de la secuencia polinucleotídica frente a la de referencia puede ser mayor, menor o igual. Cuando en el contexto de la invención se menciona, por ejemplo, que una secuencia polinucleotídica tiene un grado de homología de al menos un 80% con una secuencia determinada significa que dicha secuencia polinucleotídica puede tener una correspondencia de secuencia de entre un 100% hasta un 80% con dicha secuencia y que su longitud puede ser mayor, menor o igual al de dicha secuencia.

10 “**Grado de identidad**”: se refiere a la correspondencia de secuencia que se da entre una determinada secuencia polinucleotídica con otra. El término grado de identidad implica que la longitud de la secuencia polinucleotídica siempre es igual frente a la de referencia. Cuando en el contexto de la invención se menciona por ejemplo, que un secuencia polinucleotídica tiene un grado de identidad de al menos un 80% con una secuencia determinada significa que dicha secuencia polinucleotídica puede tener una correspondencia de secuencia de entre un 100% hasta un 80% con dicha secuencia y la misma longitud del polinucleótido de referencia.

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

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

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

5 **“Bombas de eflujo”**: Son sistemas de transporte activo presentes en las membranas celulares que mediante un mecanismo dependiente de energía sirven para bombear sustancias indeseadas al exterior.

10 **“Bombas de eflujo de tipo RND”**: son bombas de eflujo pertenecientes a la superfamilia de Resistencia-Nodulación-División y están relacionadas generalmente con la resistencia a antibióticos o a la tolerancia a disolventes.

“Bomba TtgABC”: es un sistema de eflujo presente en bacterias del género *Pseudomonas* generalmente relacionado con la resistencia a antibióticos.

15

“Bomba MexEF”: es un sistema de eflujo presente en bacterias del género *Pseudomonas* generalmente relacionado con la resistencia a antibióticos.

20 **“Construcción génica”**: es una sucesión de información genética codificada en una secuencia polinucleotídica generalmente de ADN de cadena simple o doble cadena, dispuesta de tal forma que potencialmente permite ejecutar el programa genético para el cual fue diseñada. La construcción génica comprende tanto elementos codificantes como no codificantes como por ejemplo secuencias de control. Normalmente, la construcción génica comprende al menos la secuencia que codifica la proteína o polipéptido de interés, así como
25 una o más secuencias promotoras de la expresión y al menos una secuencia de terminación.

“Operativamente unida”: implica que los diferentes elementos de la construcción génica están dispuestos de tal forma que actúan de manera operativa para ejecutar correctamente
30 el programa genético para la cual fue diseñada dicha construcción génica.

“Vector de expresión”: es un sistema de transfección o transformación de células que permite incorporar una construcción génica en una célula y cuya finalidad es la expresión por parte de dicha célula de una proteína recombinante. Los tipos de vectores de expresión
35 más habituales son plásmidos y vectores virales aunque en el contexto de la invención incluye cualquier otro tipo de vectores comúnmente usados.

“**Tolerancia mejorada a alcoholes**”: es la capacidad por la cual un microorganismo o célula microbiana presenta una resistencia superior a la normal a la toxicidad inherente de los alcoholes. En el contexto de la presente invención la tolerancia mejorada frente a alcoholes la adquieren las células microbianas gracias a la presencia de glutamina en el medio de reacción ya sea mediante síntesis endógena de la misma o por su adición al medio.

“**Célula huésped**”: es la célula capaz recibir por transfección o transformación material genético externo que es capaz de expresar de forma transitoria o estable. El término célula huésped también se refiere no solo a la célula directamente transfectada o transformada sino también a toda su progenie.

“**Célula transformada**”: es la célula resultante del proceso de incorporación de material genético exógeno llevado a cabo sobre la célula huésped por transfección o transformación.

“**Composición microbiológica**”: Se refiere a una formulación de elementos donde el elemento esencial es un microorganismo, en el contexto de la presente invención el elemento esencial es una célula microbiana modificada genéticamente con capacidad de producir glutamina endógenamente gracias a la sobreexpresión de enzimas con actividad glutamina sintetasa. La composición microbiológica está diseñada para una aplicación concreta, en el caso de la presente invención para la producción de alcoholes y de manera preferente para la producción de butanol.

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

“**Azúcar o azúcares fermentables**”: es el producto resultante preferiblemente de procesos de degradación de biomasa y comprende todos aquellos azúcares que son susceptibles de ser transformados mediante fermentación para dar lugar a alcoholes. Aunque no es el único,

el azúcar más abundante es la glucosa, aunque también son azúcares convertibles en alcoholes la xilosa, arabinosa, manosa, y otros azúcares tanto de 5 como de 6 carbonos.

5 **“Microorganismo que actúa sinérgicamente en la producción de alcoholes”**: se refiere a un microorganismo, normalmente una bacteria o levadura, que puede estar presente en la composición microbiológica de la invención y cuya misión es ayudar o facilitar a la célula bacteriana de la invención en la producción de alcoholes. Dicha ayuda puede consistir en que el microorganismo es capaz de metabolizar hacia alcoholes productos o sustancias presentes en el medio de reacción que la célula microbiana de la invención es incapaz de
10 transformar (por ejemplo algún tipo de azúcar que la célula microbiana no es capaz de metabolizar) o también en que es capaz de metabolizar productos de desecho resultantes del metabolismo de la propia célula microbiana de la invención. De manera inversa el microorganismo puede actuar sinérgicamente produciendo metabolitos que son transformados por la célula microbiana de la invención hacia alcoholes.

15

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

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

de trigo; o maíz o paja de maíz o grano de maíz o fibra de maíz; o granos o paja de cebada; o granos o paja de sorgo. La biomasa también puede ser, arroz, hierba, ramas, etc.

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

10 **“Mejorar el rendimiento en la producción de alcoholes”**: en el contexto de la invención implica un aumento de la producción alcohólica gracias al aumento o la mejora de la tolerancia a alcoholes por parte de las células microbianas de la invención.

Célula microbiana genéticamente modificada para producir glutamina endógenamente

15 El aspecto principal de la presente invención se refiere a una célula microbiana genéticamente modificada para producir glutamina de manera endógena caracterizada porque dicha célula ha sido genéticamente modificada para sobreexpresar el producto codificado por uno o más genes de enzimas con actividad glutamina sintetasa.

20 La célula microbiana de la invención puede ser tanto una célula bacteriana como una célula eucariota, normalmente una célula fúngica como un moho o una levadura. De manera preferente, la célula microbiana es una célula bacteriana o una levadura y de manera preferida una célula bacteriana.

25 De manera más particular, la invención se refiere a una célula microbiana genéticamente modificada en la que dichos genes de enzimas con actividad glutamina sintetasa cuyo producto se sobreexpresa poseen una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 o una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95% y de manera más preferida de al menos un 98% con
30 cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8.

35 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la presencia de glutamina ya sea mediante su adición al medio, mediante el aumento de precursores o mediante la sobreexpresión de las proteínas encargadas de sus síntesis como glutamina sintetetas provocaba un aumento o mejora de la tolerancia de las células a la presencia de

alcoholes en el medio. De manera particular se observó que la presencia de glutamina en el medio proporcionó a diferentes cepas de *Pseudomonas putida* (BIRD-1 y KT2440) una mejora en la tolerancia de entre 2 y 67 veces superior dependiendo de la cepa y las concentraciones de butanol presentes en el medio.

5

A partir de esta base se han desarrollado las células microbianas de la presente invención que mediante transformación genética con construcciones génicas o vectores de expresión han incorporado genes de proteínas o enzimas con actividad glutamina sintetasa de modo que son capaces de producir endógenamente glutamina y asimismo tienen una mejor tolerancia a los alcoholes.

10

Esta característica hace a las células microbianas de la invención especialmente apropiadas para procesos de producción industrial de alcoholes, en particular a partir de azúcares fermentables provenientes de procesos de degradación de biomasa, ya que al poseer una mayor tolerancia a los alcoholes producidos se pueden conseguir mayores rendimientos en los procesos de producción de alcoholes.

15

Las células microbianas de la invención son por tanto de manera preferida productoras de alcoholes ya sea de manera natural o de manera adquirida mediante manipulación genética.

20

En una realización particular la células de la invención son productoras de alcoholes de 2 a 32 carbonos, preferentemente de 2 a 12 carbonos, y manera más particular de etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol, decanol, dodecanol o mezclas de los mismos.

25

30

De manera preferida la célula microbiana de la invención es productora de 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o de mezclas de los mismos.

35

Aunque no pretende ser una lista exhaustiva, una realización particular de la invención contempla que las células microbianas de la invención pertenezcan a uno de los siguientes

géneros *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Treponema*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus*,
 5 *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Geobacillus*,
Ureobacillus, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Nocardia*, *Synechocistis*,
Staphylococcus, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Thermoanaerobacterium*, *Zymomonas*,
Candida, *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Myceliophthora*, *Trichoderma*, *Hansenula*,
Kluyveromyces, *Pichia*, *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*.

10

Aun sin ser una lista exhaustiva y de manera más particular, las células de la invención pertenecen a uno de las siguientes especies: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium belfantii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tyrobutiricum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus Brevis*, *Candida arabinofermentans*, *Candida boidinii*, *Candida diddensis*, *Candida fermentans*, *Chrysosporium lucknowense*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*,
 15 *Aspergillus nidulans*, *Myceliophthora termopila*, *Trichoderma reesei*, *Candida pastoris*,
Candida shehatae, *Candida sonorensis*, *Candida tropicalis*, *Hansenula anómala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia pastoris*, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bulderi*, *Saccharomyces barnetti*,
 20 *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces uvarum* o
 25 *Schizosaccharomyces pombe*.

La realización preferida de la invención está representada por una célula de *Pseudomonas putida* productora de alcohol, preferiblemente butanol, genéticamente modificada en la que
 30 se sobreexpresan la o las enzimas con actividad glutamina sintetasa codificadas por una o
 más de la secuencias polinucleotídicas seleccionadas entre SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2,
 SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 o
 una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80%, preferiblemente
 de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, aun más preferiblemente de
 35 al menos un 95% y de manera más preferida de al menos un 98% con cualquiera de las

secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8.

5 Como ya se ha especificado más arriba son preferidas en el contexto de la presente invención células microbianas productoras de alcoholes. Dichas células microbianas pueden ser productoras naturales de alcoholes porque de manera natural y constitutiva poseen toda la maquinaria enzimática necesaria para producir por sí mismas los alcoholes deseados. No obstante, también se contempla en la presente invención células bacterianas que aun no siendo productoras naturales de alcoholes han sido modificadas genéticamente para
10 expresar uno o más genes que favorezcan determinadas rutas metabólicas para mejorar la producción de algún o algunos tipos de alcoholes. Incluso se contempla en la presente invención la modificación genética para incorporar genes exógenos de rutas metabólicas completas.

15 Por ejemplo, y de manera particular, la presente invención contempla la transformación de una célula microbiana con capacidad para producir glutamina de acuerdo con la invención, con uno o más de los genes de la vía sintética para la producción de 1-butanol. Dicha ruta sintética aparece descrita en la solitud US2008/0274524 cuyo contenido se considera aquí incorporado. La vía sintética para producir 1-butanol comprende las siguientes conversiones
20 de sustrato a producto:

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

30 De manera particular, la presente invención también contempla la transformación de una célula microbiana con capacidad para producir glutamina de acuerdo con la invención, con uno o más de los genes de la vía sintética para la producción de 2-butanol. Dicha ruta sintética aparece descrita en las solicitudes US2007/025941 y US2007/0292927 cuyo contenido se considera aquí incorporado. La vía sintética para producir 2-butanol comprende
35 las siguientes conversiones de sustrato a producto:

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

De nuevo de manera particular, la presente invención también contempla la transformación de una célula microbiana con capacidad para producir glutamina de acuerdo con la invención, con uno o más de los genes de la vía sintética para la producción de isobutanol. Dicha ruta sintética aparece descrita en la solicitud US2007/0092957 cuyo contenido se considera aquí incorporado. La vía sintética para producir isobutanol comprende las siguientes conversiones de sustrato a producto:

- 15 a) piruvato a acetolactato, catalizada por ejemplo por la acetolactato sintasa
- b) acetolactato a 2,3-dihydroxiisovaleriato, catalizada por ejemplo por la ácido acetohidroxi isomeroreductasa
- c) 2,3-dihidroxiisovaleriato a α -cetoisovalerato, catalizada por ejemplo por la ácido acetohidroxi deshidratasa
- 20 d) α -cetoisovalerato a isobutiraldehído, catalizada por ejemplo por una cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada y
- e) isobutiraldehído a isobutanol, catalizada por ejemplo por una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada.

25 Una realización particularmente preferida de la presente invención viene representada por una célula con capacidad para producir glutamina mediante la sobreexpresión del producto codificado por uno o más genes de enzimas con actividad glutamina sintetasa, por ejemplo, de los genes cuya secuencia se selecciona entre SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 o una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, aun más preferiblemente de al menos un 95% y de manera más preferida de al menos un 98% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, que ha sido adicionalmente transformada para sobreexpresar una o más bombas de eflujo de tipo RND, preferiblemente las bombas TtgABC y/o MexEF.

35

En una realización preferida de este aspecto de la invención, las células de la invención han sido modificadas genéticamente para sobreexpresar una o más bombas de eflujo de tipo RND codificadas por las secuencias SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 o por una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95% y de manera más preferida de al menos un 98% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12 o SEQ ID NO 13.

La combinación del sistema basado en la síntesis endógena de glutamina por parte de las células microbianas con el sistema de bombas de eflujo aquí descrito proporciona un aumento muy significativo de la tolerancia frente a alcoholes en comparación con cualquiera de los dos sistemas de manera independiente. El hecho de que ambos sistemas representen mecanismos autónomos para generar tolerancia a alcoholes hace que se de un efecto sinérgico que potencia el efecto sobre la tolerancia a alcoholes de ambos.

Construcción génica

Otro aspecto adicional de la invención es una construcción génica que comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican una o más enzimas con actividad glutamina sintetasa operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de proteínas en sistemas de expresión.

En una realización particular y preferida de la invención las secuencias polinucleotídicas que codifican la o las enzimas con actividad glutamina sintetasa incorporadas en la construcción génica son una o más de las secuencias seleccionadas entre SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 o una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95% y de manera más preferida de al menos un 98% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8.

Las secuencias de control pueden ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por el sistema de expresión (célula huésped) para la expresión del polipéptido de la invención. Los promotores contienen secuencias de control transcripcional que median la expresión del

polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos y pueden ser obtenidos de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares ya sean homólogos o heterólogos a la célula huésped.

5

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los polipéptidos de la invención en células huésped bacterianas pueden ser el promotor funcional en bacterias gram negativas Ptrc híbrido o los promotores obtenidos del gen alfa-amylasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), del gen alfa-amylasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), del gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), del gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), del gen de la levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), de los genes xylA and xylB *Bacillus subtilis*, del gen cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse and Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), del operon lac de *E. coli*, del promotor trc de *E. coli* (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), del gen agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), y del gen beta-lactamase procariotico (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), así como del promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Promotores adicionales se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" Gilbert et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York. Ejemplos de promotores tándem se describen en WO 99/43835.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en células hospedadoras de hongos filamentosos pueden ser los promotores obtenidos de los genes de la acetamidasa de *Aspergillus nidulans* acetamidase, de la alfa amilasa neutra de *Aspergillus niger*, de la alfa amilasa acidoestable de *Aspergillus niger*, de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* glucoamylase (glaA), de la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, de la proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, de la proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), de la aminoglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), de la lipasas de *Rhizomucor miehei*, de la proteinasa aspartica de *Rhizomucor miehei*, de la beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, de la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, de la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, de la endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, de la endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, de la endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, de la xilanasa I de *Trichoderma reesei*, de la xilanasa II de

Trichoderma reesei, de la xilanasa III de *Trichoderma reesei*, de la beta xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y del factor de elongación de la traducción de *Trichoderma reesei*, así como de promotor NA2-tpi (un promotor modificado del gen de la alfa amilasa neutra de *Aspergillus* en la que la secuencia líder no traducida se ha sustituido por una secuencia líder no traducida de un gen de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados del gen de la alfa amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el que la secuencia líder no traducida se ha sustituido por una secuencia líder no traducida del gen de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados, e híbridos de los mismos. Otros promotores se describen en US6011147. Otro promotor adecuado es el promotor Pcbh de *Myceliophthora termophila*.

En células de levaduras los promotores útiles se pueden obtener de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), de la galactoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), de la alcohol deshidrogenasa/gliceroaldehído-3-fosfatasa deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), de la triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), de la metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y la 3 fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para levaduras se describen en Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

La secuencia de control puede también ser un terminador de la transcripción, que es reconocido por la célula huésped para terminar la transcripción. El terminador está operativamente unido al término 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped puede usarse en el contexto de la presente invención.

Algunos terminadores apropiados para células huésped bacterianas pueden obtenerse a partir de genes de la proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (aprH), de la alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), y *Escherichia coli* ribosomal RNA (rrnB) o de RNA polimerasa factor sigma (rpoH) de *Pseudomonas putida*.

Algunos terminadores adecuados para células huésped de hongos filamentosos se pueden obtener de los genes acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, de la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans anthranilate*, de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, de la alfa glucosidasa de *Aspergillus niger*, de la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, de la proteasa semejante a tripsina de *Fusarium oxysporum*, de la beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, de la celobiohidrolasa II

de *Trichoderma reesei*, de la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, de la endoglucanasa II *Trichoderma reesei*, de la endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, de la endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, de la xilanasa I de *Trichoderma reesei*, de la xilanasa II de *Trichoderma reesei*, de la xilanasa III de *Trichoderma reesei*, de la beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* y del factor de elongación de traducción de *Trichoderma reesei*. Otra secuencia terminadora es la secuencia Tcbh.

Algunos terminadores adecuados para células huésped de levaduras se pueden obtener a partir de genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, del citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles en levaduras se describen en Romanos et al., 1992, *Yeast* 8: 423-488.

La secuencia control puede ser también una región estabilizadora del RNAm posterior al promotor pero anterior a la secuencia codificante de un gen que incremente la expresión del gen. Ejemplos de secuencias estabilizadoras de RNAm se pueden obtener del gen cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* (WO 9425612) del gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, *Journal of Bacteriology* M1: 3465-3471).

La secuencia de control puede ser también una secuencia líder, una región no traducida del RNAm que es importante en la traducción por parte de la célula huésped. La secuencia líder está operativamente unida a la región 5' terminal del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder funcional en la célula huésped puede usarse.

Secuencias líder adecuadas en hongos filamentosos se pueden obtener de los genes de la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

Secuencias líder apropiadas para levaduras se pueden obtener de los genes de la enolasa de *Sacharomyces cerevisiae* (ENO-1), de la 3-fosfogliceratoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, del de factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y del de la alcohol deshidrogenasa/Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

35

La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación una secuencia operativamente unida a término 3' del polinucleótido y que cuando es transcrito la célula huésped la reconoce como una señal para añadir residuos poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier señal de poliadenilación funcional en la célula huésped puede ser usada.

5

Algunas secuencias de poliadenilación adecuadas para células huésped de hongos filamentosos se pueden obtener a partir de los genes de la antranilato sintasas de *Aspergillus nidulans*, de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, de la alfa-glicosidasa de *Aspergillus niger*, de la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y de la proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum*.

10

Secuencias de poliadenilación útiles en células huésped de levaduras se describen en Guo and Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

15

También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión del polipéptido en función al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que causan que la expresión del gen se active o se inactive en respuesta a estímulos químicos o físicos, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Secuencias reguladoras sistemas procariotas incluyen los sistemas operadores lac, tac y trp. En levaduras se pueden usar los sistemas ADH2 o GAL1. En hongos filamentosos se pueden usar el promotor glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor TAKA alfa amilasa de *Aspergillus oryzae*, y el promotor glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*, el promotor celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* el promotor celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei* y el promotor Pcbh de *Myceliophthora thermophila*.

20

25

Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen las secuencias reguladoras del gen de la dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de la metalotioneina que se amplifican con metales pesados. En estos casos el polinucleótido que codifica el polipéptido estaría operativamente unido a la secuencia reguladora.

30

35

El vector de expresión

En otro aspecto la invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una o varias enzimas con actividad glutamina sintetasa como, por ejemplo, una o más de las secuencias seleccionadas entre SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 o una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95% y de manera más preferida de al menos un 98% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 o un vector de expresión que comprende una construcción génica como la descrita anteriormente.

El vector de expresión comprende la secuencia polinucleotídica que codifica una o varias enzimas con actividad glutamina sintetasa tal y como se mencionaba antes, al menos un promotor y señales de terminación transcripcionales y traduccionales. Las diferentes secuencias polinucleotídicas y de control pueden estar unidas para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido de interés en dichos sitios.

Alternativamente, el polinucleótido puede expresarse mediante la inserción del o los polinucleótidos antes mencionados o de la construcción génica de la invención en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión la secuencia codificante debe estar operativamente unida con las secuencias de control apropiadas para garantizar la expresión. El vector de expresión puede ser cualquier vector (por ejemplo virus o plásmido) que pueda ser sometido a procesos de ADN recombinante y que pueda llevar a cabo la expresión del polinucleótido de interés. La elección del vector depende esencialmente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la cual vaya a ser introducido el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular.

El vector puede ser un vector autónomamente replicante, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosomal y cuya replicación es independiente de la replicación del cromosoma como, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosomal, un

minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar su autoreplicación.

5 Asimismo, el vector puede ser uno que al ser introducido en la célula huésped se integra en el genoma y se replica junto con el o los cromosomas en los cuales se inserta. Además se puede usar un vector único o plásmido o más vectores o plásmidos que conjuntamente contengan el ADN total que ha de ser introducido en el genoma de la célula huésped o también un transposón.

10 El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores que permiten la selección sencilla de células transformadas o transfectadas. Un marcador de selección es un gen cuyo producto proporciona resistencia a un producto, un virus, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos etc.

15 Ejemplos de marcadores de selección adecuados para bacterias son los genes DAL de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomina o tetraciclina.

20 Marcadores apropiados para levaduras incluyen pero no se limitan a ellos, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3.

Marcadores de selección para uso en hongos filamentosos incluyen pero no se limitan a, adeA (fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa), adeB (fosforibosil-
25 aminoimidazol sintasa), amdS (acetamidasa), argB (ornitina carbamoiltransferasa), bar (fosfotricin acetiltransferasa), hph (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato decarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa) y trpC (antranilato sintasa) y equivalentes de los mismos. Los marcadores preferidos para células de *Aspergillus* son los genes amdS y Pyr G de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el
30 gen bar de *Streptomyces hygroscopicus*. Los marcadores preferidos para células de *Trichoderma cell* son los genes adeA, adeB, amdS, hph, y pyrG. Otros marcadores preferidos son Pyr 4, Pyr 5, CysC y trp.

El vector de la invención debe contener preferiblemente elementos que permitan la
35 integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula de manera independiente al genoma. Para la integración en el genoma el

vector puede contener elementos de integración por recombinación homóloga o no homóloga. Incluso, puede incluir secuencias polinucleotídicas para dirigir la integración por recombinación homóloga en locus concretos en el(los) cromosoma(s). El elemento integracional puede ser cualquier secuencia homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además los elementos integracionales pueden ser secuencias codificantes o no codificantes.

Para la replicación autónoma, el vector de la invención puede comprender un origen de replicación que le permita al vector autorreplicarse en la célula huésped. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plasmídico que funcione en la célula huésped.

Ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177, pBBR1, pUC, RK2, R6K y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, pUB1 10, pE194, pTA1060 y [rho][Alpha][Mu][beta][Iota] que permiten la replicación en *Bacillus*, pHT231, pBBRMC5 y la serie pSEVA con el origen de replicación de RSF1010 que permiten la replicación en *Pseudomonas*.

Ejemplos de orígenes de replicación para usar en levaduras son los orígenes de replicación de dos micrones ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

Ejemplos de orígenes de replicación en hongos filamentosos son AMA1 y ANSI (Gems et al., 1991, Gene 98: 61 -67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 0024883). WO0024883 describe cómo se puede conseguir el aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que lo comprenden.

Se pueden insertar más de una copia del mismo polinucleótido o de diferentes polinucleótidos en la célula huésped para incrementar la producción y/o variedad de enzimas con actividad glutamina sintasa y/o sintetasa expresadas. El incremento en el número de copias del polinucleótido se puede conseguir integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped.

Método para producir una célula microbiana con tolerancia mejorada frente a alcoholes

Otro aspecto relevante de la invención lo representa un método para producir células microbianas con tolerancia mejorada a alcoholes que comprende:

a) introducir en una célula huésped microbiana una construcción génica de acuerdo con la invención o un vector de expresión de acuerdo con la invención,

5 b) Aislar las células transformadas que hayan incorporado la construcción génica o el vector de expresión en la etapa a).

Cualquier medio comúnmente conocido para introducir material genético en células huésped como transformación de protoplastos, transformación de células competentes, electroporación o conjugación puede ser usado para transformar o transfectar las células
10 huésped.

En una realización particular y preferida, la transformación se lleva a cabo por medio de electroporación.

15 Las células huésped usadas en el método deben tener de manera preferible la capacidad para producir alcoholes ya sea de manera natural o adquirida mediante manipulación genética.

En una realización particular la células de la huésped usadas en el método son productoras
20 de alcoholes de 2 a 32 carbonos, preferentemente de 2 a 12 carbonos, y manera más particular de etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol, decanol, dodecanol o mezclas de los mismos.

30 De manera preferida la célula huésped microbiana usada en el método de la invención es productora de 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o de mezclas de los mismos.

Sin pretender ser una lista exhaustiva la célula huésped microbiana utilizada en el método pertenece a uno de los siguientes géneros *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*,
35 *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*,

Proteus, Vibrio, Pseudomonas, Bacteroides, Acetobacter, Aerobacter, Agrobacterium, Azotobacter, Spirilla, Serratia, Vibrio, Rhizobium, Chlamydia, Rickettsia, Treponema, Fusobacterium, Actinomyces, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Erysipelothrix, Lactobacillus, Listeria, Mycobacterium, Myxococcus, Nocardia, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces, Thermoanaerobacterium, Zymomonas Candida, Chryso sporium, Aspergillus, Myceliophthora, Trichoderma, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces o Schizosaccharomyces..

Aun sin pretender ser una lista exhaustiva, y de manera más particular, la célula huésped microbiana usada en el método de la invención se selecciona entre *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium belfantii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tyrobutiricum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Escherichia coli*, *Entorococcus faecium* o *Lactobacillus Brevis* *Candida arabinofermentans*, *Candida boidinii*, *Candida diddensis*, *Candida fermentans*, *Chryso sporium lucknowense*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Myceliphthora termopila*, *Trichoderma reesei*, *Candida pastoris*, *Candida shehatae*, *Candida sonorensis*, *Candida tropicalis*, *Hansenula anómala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia pastoris*, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bulderi*, *Saccharomyces barnetti*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces uvarum* o *Schizosaccharomyces pombe..*

La realización preferida de la invención contempla el uso como célula huésped una célula de *Pseudomonas putida* que, por otro lado, es productora de alcoholes y en particular de 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o de mezclas de los mismos.

En la etapa b) del método, el aislamiento de las células transformadas se lleva a cabo por cualquier método comúnmente usado por cualquier experto en la materia, típicamente mediante marcadores de selección presentes en las construcciones génicas y/o vectores de expresión que permiten la selección de las células transformadas frente a las células no transformadas. Ejemplos de marcadores de selección son marcadores de resistencia a un producto como por ejemplo a antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomicina o tetraciclina), a un virus, de resistencia a metales pesados, prototrofia, auxotrofia etc.

Una realización particular del método de la invención comprende una etapa opcional en la cual la célula microbiana aislada en la etapa b) es adicionalmente transformada mediante:

- 5 a) una construcción génica que comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican bombas de eflujo de tipo RND, preferentemente bombas TtgABC o MexEF operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de polipéptidos en sistemas de expresión o
- 10 b) un vector de expresión que comprende una construcción génica que comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican bombas de eflujo de tipo RND, preferentemente bombas TtgABC o MexEF operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de polipéptidos en sistemas de expresión.

De nuevo la transformación puede llevarse a cabo mediante cualquier medio comúnmente conocido para introducir material genético en células huésped como transformación de protoplastos, transformación de células competentes, electroporación o conjugación, aunque de manera preferida la transformación se lleva a cabo por electroporación.

En una realización preferida de esta realización la o las secuencias polinucleotídicas que codifican bombas de eflujo de tipo RND se seleccionan entre las SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 o de una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95% y de manera más preferida de al menos un 98% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12 o SEQ ID NO 13.

Composición microbiológica para la producción de alcoholes

Otro aspecto de la invención es una composición microbiológica para producir alcoholes que comprende células microbianas genéticamente modificadas para producir glutamina por sobreexpresión de enzimas con actividad glutamina sintetasa de acuerdo con la invención y, opcionalmente, al menos un elemento adicional que favorezca la producción de alcoholes.

La composición de la invención comprende como elemento esencial de la misma, células productoras de glutamina tal y como han sido descritas en la presente invención. Como se trata de una composición dirigida a la producción de alcoholes las células deben tener la

capacidad de producir alcoholes ya sea de manera natural o de manera adquirida por medio de manipulación genética como se explicaba más arriba.

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

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

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

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

30 Otros elementos que se pueden adicionar a la composición para suplementar el medio de cultivo son fuentes de nitrógeno o azufre que son elementos esenciales para los microorganismos. Estos elementos pueden ser cubiertos de modo muy distinto, dependiendo del tipo de microorganismo que consideremos aunque pueden presentarse en forma de NO_3^- , amonio (NH_4^+), aminoácidos o péptidos para el caso del nitrógeno y como
35 SO_4^{2-} , sulfuros (S^{2-} , SH^-) o azufre orgánico (cisteína, metionina).

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

5

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

10

Por último, puede ser necesario incorporar en un medio de cultivo apropiado factores de crecimiento que son moléculas orgánicas que algunos microorganismos necesitan en muy pequeña cantidad para crecer. Suelen ser coenzimas o sus precursores, vitaminas, que determinados microorganismos no pueden fabricar por sí mismos, al carecer de parte o toda una ruta biosintética. Algunos de estos factores de crecimiento son el ácido p-aminobenzoico (PABA), el ácido fólico, la biotina, la cobalamina (vitamina B12), la niacina (ácido nicotínico, la riboflavina, el ácido pantoténico, la tiamina (vitamina B1), complejo B6 (pirodoxal, piridoxamina) o grupo K, quinonas.

15

20

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

25

En otra realización particular el elemento adicional que favorece la producción puede ser otro microorganismo que actúa sinérgicamente en la producción de alcoholes. Dicho microorganismo puede ser una bacteria o algún otro microorganismo como una levadura, por ejemplo. La idea del uso de estos microorganismos en la composición microbiológica de la invención es que puedan metabolizar hacia alcoholes productos o sustancias presentes en el medio de reacción que la célula microbiana de la invención es incapaz de transformar (por ejemplo algún tipo de azúcar que la célula microbiana no sea capaz de metabolizar) o

35

también en que sean capaces de metabolizar productos de desecho resultantes del metabolismo de la propia célula microbiana de la invención para potenciar el rendimiento de la producción de alcoholes. De manera inversa, el microorganismo puede actuar sinérgicamente produciendo metabolitos que son transformados por la célula microbiana de la invención hacia alcoholes. De manera particular aunque no limitativa algunos microorganismos que pueden ser usados como microorganismos sinérgicos en la producción de alcoholes *Zymomonas*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia*, *Deinoccus*, *E. coli*, *Klebsiella* y otros.

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

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

Uso de una célula microbiana con tolerancia mejorada frente a alcoholes

Otro aspecto general de la invención se refiere al uso de la célula microbiana de la invención o de la composición de la invención para mejorar el rendimiento en la producción de alcoholes.

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

El uso aquí descrito tiene su fundamento en el hecho de que, las células de la invención, al producir glutamina y tener una mejor tolerancia a los alcoholes, son capaces crecer y producir alcoholes en condiciones de mayor concentración de alcoholes que las cepas

silvestres de las cuales provienen resultando esto en un rendimiento mayor de la producción.

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

Una realización particular y preferida de la invención contempla el uso de una célula microbiana de acuerdo de la invención o de la composición de la invención para mejorar el rendimiento en la producción de 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o mezclas de los mismos.

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

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

En una realización particular, el procedimiento de la invención contempla suplementar el medio de incubación con glutamina exógenamente. La finalidad es potenciar más el efecto de tolerancia a alcoholes generado por la producción endógena de glutamina por parte de las células de la invención.

Las condiciones para llevar a cabo la fermentación dependerán principalmente del tipo de bacteria o microorganismo utilizado. Normalmente, las condiciones se adaptarán a las

condiciones óptimas en las que el microorganismo en cuestión lleve a cabo el proceso de fermentación. Aunque no hay unas condiciones fijas, típicamente el tiempo de fermentación varía entre 24 y 96 horas, la temperatura entre 26°C y 60°C, preferentemente entre 32°C y 50°C y el pH entre 3 y 9, preferentemente entre 4 y 5, entre 4 y 6 o entre 4 y 7, entre 5 y 8 y entre 6 y 9.

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

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

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

En otra realización particular y preferida el procedimiento es un procedimiento de producción de 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o mezclas de los mismos.

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

La etapa b) del procedimiento de producción de alcoholes comprende la recuperación de los mismos. El o los alcoholes producidos pueden recuperarse del medio de fermentación mediante cualquier método conocido incluyendo pero sin limitarse a cromatografía, procesos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, los alcoholes pueden separarse del caldo de fermentación por métodos convencionales de destilación.

Procedimiento para aumentar la producción de alcoholes por adición de glutamina al medio

En un último aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para aumentar la producción de alcoholes en procesos fermentativos que comprende:

- a) Incubar una célula microbiana productora de alcoholes en un medio con azúcares fermentables suplementado con glutamina o un precursor de la glutamina,
- b) Recuperar los alcoholes producidos en la etapa a)

El aumento en la producción de alcoholes se da en el procedimiento aquí descrito por el incremento de la tolerancia de las células microbianas productoras de alcoholes al efecto tóxico de los mismos. Al incrementarse la tolerancia las células son capaces de crecer y producir alcohol a concentraciones mayores resultando esto en el aumento de la producción.

Aunque los tipos de azúcares fermentables apropiados para la fermentación dependerán del tipo de bacteria o microorganismo utilizado y el tipo de fermentación alcohólica que se desee potenciar, el más habitual es la glucosa, aunque no excluye xilosa, arabinosa, manosa y otros azúcares de 5 y 6 carbonos. De hecho una realización preferida de la invención contempla el uso de glucosa como azúcar fermentable.

Las condiciones para llevar a cabo la fermentación dependerán principalmente del tipo de bacteria o microorganismo utilizado. Normalmente, las condiciones se adaptarán a las condiciones óptimas en las que el microorganismo en cuestión lleve a cabo el proceso de fermentación. Aunque no hay unas condiciones fijas, típicamente el tiempo de fermentación varía entre 24 y 96 horas, la temperatura entre 26°C y 60°C, preferentemente entre 32°C y 50°C y el pH entre 3 y 9, preferentemente entre 4 y 5, entre 4 y 6 o entre 4 y 7, entre 5 y 8 y entre 6 y 9.

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

En una realización particular de la invención la célula microbiana utilizada en el proceso de fermentación pertenece a uno de los siguientes géneros *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Treponema*, *Fusobacterium* *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Nocardia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* *Streptomyces* *Thermoanaerobacterium*, *Zymomonas* *Candida*, *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Myceliophthora*, *Trichoderma*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*.

En una realización aún más particular, la célula microbiana pertenece a una de las siguientes especies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium belfantii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tyrobutiricum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus Brevis*, *Candida arabinofermentans*, *Candida boidinii*, *Candida diddensis*, *Candida fermentans*, *Chrysosporium lucknowense*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Myceliophthora termopila*, *Trichoderma reesei*, *Candida pastoris*, *Candida shehatae*, *Candida sonorensis*, *Candida tropicalis*, *Hansenula anómala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia pastoris*, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bulderi*, *Saccharomyces barnetti*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces uvarum* o *Schizosaccharomyces pombe*.

La realización preferida contempla el uso como célula productora de alcoholes una cepa de *Pseudomonas putida* productora de alcoholes, preferiblemente productora de butanol.

En función de la bacteria o microorganismo usado se obtendrán diferentes alcoholes ya que cada microorganismo tiene un metabolismo característico y propio. En este sentido un experto en la materia seleccionará el microorganismo más conveniente en función del alcohol o alcoholes que desee obtener. Sin pretender ser una lista limitativa algunos de las

5 células microbianas pueden ser productoras de alcoholes de entre 2 y 32 carbonos, preferiblemente de entre 2 y 12 carbonos y de manera particular etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol,

10 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-

15 pentanol, decanol, dodecanol o de combinaciones de los mismos.

De manera preferida, la célula microbiana es productora de 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o mezclas de los mismos.

20 Una realización particular y preferida del procedimiento para aumentar la producción de alcoholes en procesos fermentativos aquí descrita comprende el uso como célula microbiana productora de alcoholes una célula que ha sido previamente transformada mediante:

- 25 a) una construcción génica que comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican una o más bombas de eflujo de tipo RND, preferentemente bombas TtgABC o MexEF, operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de polipéptidos en sistemas de expresión o
- 30 b) un vector de expresión que comprende una construcción génica que comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican una o más bombas de eflujo de tipo RND, preferentemente bombas TtgABC o MexEF, operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de polipéptidos en sistemas de expresión.

35

De manera más particular y preferida, la o las secuencias polinucleotídicas que codifican bombas de eflujo de tipo RND se seleccionan entre la SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 o una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80% preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, aun más preferiblemente de al menos un 95% y de manera más preferida de al menos un 98% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12 o SEQ ID NO 13.

Una realización particular del procedimiento contempla usar como célula productora de alcoholes en el medio suplementado con glutamina a las células microbiana de la invención, es decir, las células micorobianas modificadas genéticamente para sobreexpresar glutamina sintetasas. De este modo el efecto de la glutamina sobre la tolerancia se ve potenciado ya que además de la glutamina suplementada al medio las propias células la sintetizan aumentando su efecto protector.

15

EJEMPLOS

Ejemplo 1: análisis proteómico de *Pseudomonas putida* en situación de estrés por butanol

20 Para la identificación potenciales genes implicados en la tolerancia a alcoholes se analizó el proteoma de *Pseudomonas putida* BIRD-1 en situación de estrés por butanol frente a cultivos de *Pseudomonas putida* BIRD-1 en condiciones normales.

Para estudiar el proteoma, las células cultivadas en las distintas condiciones se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 2 minutos y se lavaron con medio M9 sin ninguna fuente de carbono, a continuación, las células se almacenaron a -80°C .El precipitado de células se resuspendió en 5 volúmenes de tampón P (fosfato de sodio a pH 8.2 suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). Las células se lisaron a 4 °C mediante sonicación usando un equipo UP50H Ultrasonic Processor (Hielscher Ultrasonics GmbH; 30 max. output 45W) sonicator.

El contenido de proteína de las fracciones solubles resultantes se cuantificó mediante el kit de ensayo de proteínas basado en el método de Bradford (BioRad). Se añadió tampón de muestra de gel de proteína (LDS (Invitrogen, Dodecil sulfato de litio - β - mercaptoetanol) en una proporción de 10 μ l por 50 g de proteínas. Para la fracción específica de proteínas de membrana, el pellet obtenido tras la sonicación se resuspendió en 1 ml de tampón P. Las

muestras se centrifugaron durante 30 min a 13.000 xg y el material sedimentado se lavó dos veces con tampón P para eliminar proteínas contaminantes citosólicas. Los precipitados finales se resuspendieron en 20 µl de tampón de muestra de gel de proteína LDS. Las muestras de proteínas solubles y las fracciones específicas de proteína de membrana se incubaron luego a 99 °C durante 5 min antes de la cromatografía en SDS-PAGE.

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

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

La condición en fase exponencial de *Pseudomonas putida* BIRD-1 en la comparación de la situación de crecimiento en medio mínimo suplementado con glucosa 0,5 % (v/v) respecto de butanol como fuente de carbono 0,3 % se observó la sobreexpresión de glutamina sintetasas putativas que se correspondían con PPUBIRD1_4978 (SEQ ID NO 1) y PP_4979 (SEQ ID NO 2) (3,7 y 6,8 respectivamente).

Ejemplo 2: Cinética de muerte de *Pseudomonas putida* KT2440 y BIRD-1 en presencia y ausencia de glutamina

Para cuantificar la supervivencia en presencia y ausencia de glutamina se realizaron cinéticas de muerte en presencia y ausencia de la misma. Las células de *Pseudomonas*

putida BIRD-1 y KT2440 se cultivaron en LB, al día siguiente los cultivos se diluyeron hasta alcanzar una densidad óptica de 0,05 y se dejaron crecer hasta una DO aproximadamente de 0,8 (DO660nm). A continuación, los cultivos se separaron en cinco alícuotas, 1%, de 2% butanol (v/v) se añadió a una parte y la otra se le añadió butanol en presencia de glutamina 3mM, la última parte se utilizó como control. El número de células viables en diferentes momentos después de la aplicación de choque se determinó mediante el inóculo de una gota en placa a las diluciones apropiadas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se representan en la siguiente tabla y se representan gráficamente en la figura 1.

10

**Supervivencia media (%)
t=90 minutos**

Los

	Inducida con L-Gln 3 mM	Sin inducir	Mejora (número de veces)
BIRD1 1 %	4,8502%	4,5593%	1,06X
BIRD1 2%	0,8398%	0,0517%	16,25X
KT2440 1%	0,3703%	0,0055%	67,40X
KT2440 2 %	0,0337%	0,0068%	4,97X

resultados demuestran que la presencia de L-glutamina proporciona una mejora significativa en la supervivencia de las cepas BIRD-1 y KT2440, tanto en presencia de butanol al 1% como al 2%.

15

Ejemplo 3: identificación de genes con actividad glutamina sintasa/sintetasa en el genoma de *Pseudomonas putida* BIRD-1

20

Los genes PPUBIRD1_4978 (SEQ ID NO 1) y PP_4979 (SEQ ID NO 2) que se identificaron como sobreexpresados en el análisis proteómico del ejemplo 1 fueron identificados como glutamina sintetisas putativas (EC6.3.1.2).

25

Se buscaron por similitud de secuencia en el genoma de *Pseudomonas putida* BIRD-1 otras enzimas EC 6.3.1.2 que lleven a cabo la síntesis de glutamina a partir de glutamato. El análisis de homología en la base KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) permitió identificar los genes PPUBIRD1_1351 (SEQ ID NO 3), PPUBIRD1_4835 (SEQ ID NO 4), PPUBIRD1_1443 (SEQ ID NO 5), PPUBIRD1_2584 (SEQ ID NO 6), PPUBIRD1_5092 (SEQ

ID NO 7) y PPUBIRD1_3473 (SEQ ID NO 8), además de por supuesto los genes PPUBIRD1_4978 (SEQ ID NO 1) y PP_4979 (SEQ ID NO 2).

Ejemplo 4: Construcción del vector de expresión para glutamina sintetasa putativa de *Pseudomonas putida*

5

Se eligió el gen de la glutamina sintetasa PPUBIRD1_4979 para la construcción de un vector de expresión. El gen de esta glutamina sintetasa posee 789 pb y tiene la secuencia identificada como SEQ ID NO 2 y codifica un polipéptido de 262 aminoácidos.

10

El vector elegido para subclonar el gen PPUBIRD1_4979 fue el pSEVA438. Dicho vector contiene un gen de resistencia a estreptomicina/espectinomicina, el promotor Pm y el polilinker (multicloning site). Incluye así también los orígenes pBBR-1.

15

Para subclonar el fragmento de interés se siguió el siguiente procedimiento:

- Diseño de los cebadores para amplificar el fragmento de interés y digestión.

20

Se procedió a diseñar cebadores empleando la secuencia de dicho gen y se decidió insertar en los cebadores señales de reconocimiento de dos enzimas de restricción diferentes para que la inserción del gen fuera dirigida (HindIII/EcoRI) ya que estas no cortaban dentro de la secuencia del gen y tan sólo cortaban una vez cada una en el vector, de forma que este podía abrirse para insertar PPUBIRD1_4979 (ver figura 2). Tras la PCR se limpió de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se digirió HindIII/EcoRI unos 500 ng de fragmento. Los cebadores empleados fueron los siguientes:

25

PF TGA/AGCTTAGGTGTTGCATCATGTCGGT (SEQ ID NO 14)

PR GTCAG/AATTCATTTTCGAGGGCTGAAGCCTG (SEQ ID NO 15)

- Preparación de los cultivos de la cepa que contiene el vector pSEVA438.

30

Se prepararon cultivos en medio líquido Luria-Bertani (LB) suplementados con estreptomicina (100 µg/mL). Para el cultivo del vector, *E. coli* conteniendo el vector (se seleccionó una colonia de la placa) se inoculó en 5 ml de LB suplementado con Sm (el vector tiene resistencia a este antibiótico) y se realizaron extracciones plasmídicas y se digirió HindIII/EcoRI.

35

- Purificación de bandas del vector e inserto.

Se empleó el kit para purificación de los fragmentos de gel (vector e inserto): Quiagen Gen Extraction kit.

En el último paso del protocolo a seguir del kit, se eluyeron los fragmentos en 30 µl para que estuvieran lo más concentrado posible ya que este era su último paso de purificación antes de la ligación.

-Clonaje

Se procedió al clonaje mediante el empleo de la DNA ligasa del fago T4 empleando proporciones inserto:vector 4:1.

10

Ejemplo 5: Transformación y selección de *Pseudomonas putida* BIRD-1

- Transformación (con células ya competentes, por electroporación)

Las células competentes utilizadas fueron de BIRD-1. Los 10 µl de reacción de ligación se introducen en un tubo conteniendo 100 µl de células ya competentes. El proceso se llevó a cabo tanto para la ligación como para la religación:

- 1) Se mantuvo en hielo el ADN + células durante 30 minutos.
- 2) Se procedió a la electroporación de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Biorad).
- 3) Se adicionó 1 ml de LB y se dejó incubar a 30°C durante 1 hora y 30 minutos (sin adicionar antibióticos)
- 4) Se sembró en placa con antibiótico (estreptomicina) y se dejaron incubando a 30°C las placas hasta el día siguiente.

- Extracción del DNA plasmídico (vector) y cuantificación de ADN (ácido desoxirribonucleico) por Nano-Drop para comprobación de colonias positivas.

Para la extracción del ADN plasmídico a partir de cultivos ON se empleó el kit "Quiagen Miniprep". Para cuantificar el ADN extraído se empleó el equipo Nano-drop ND-1000. Así las cantidades de ADN obtenidas fueron de 44,5 ng/µl para de vector.

- Digestión del vector.

El vector empleado posee unas 5,140 pb. Al cortar con las enzimas de restricción se liberó un fragmento de 700 pb.

Se emplearon para ello 2,5 µg de plásmido. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 35 µl.

Se necesitó, en orden de adición al tubo:

1. Agua desionizada: 1 µl (hasta completar el volumen final)

2. Tampón H (Roche) (10X): 3,5 µl
3. ADN (vector purificado): 28 µl
4. Enzimas para la digestión (HindIII) y EcoRI (New England Biolabs): 1,25 µl de cada enzima

5

La reacción se dejó incubando a 37°C durante dos horas y media.

El gel se corrió durante 20 minutos a 135V y posteriormente se tiñó en RedSafe ® para visualizar las bandas durante 20 minutos.

10

Tras la elección de los clones positivos se procedió a la medida de L-Glutamina empleando el kit de Sigma-Aldrich.

Ejemplo 6: Cuantificación de la producción de glutamina

15

La producción de glutamina por parte de las células de *Pseudomonas putida* BIRD-1 transformadas se llevó a cabo de manera indirecta mediante la medida del glutati6n (GSH) intracelular ya que la glutamina es precursora de este metabolito. El Kit de ensayo de GSH (Cayman Chemicals) utiliza un método enzimático para la cuantificación de GSH.1. El grupo sulfhidrilo de GSH reacciona con DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico, reactivo de Ellman) y produce 5-tio-2-nitrobenzoico amarillo (TNB) de color amarillo. El disulfuro mixto, GSTNB (entre GSH y TNB) que se produce de forma concomitante, se reduce por la glutati6n reductasa para reciclar el GSH y producir más TNB. La tasa de producción TNB es directamente proporcional a esta reacción de reciclaje que a su vez es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra.

25

Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 3. Los resultados indican que las células transformadas producen glutamina de una manera significativamente superior a las no transformadas. Este aumento se puede inferir de manera indirecta por la mayor detección de GSH intracelular en las células transformadas.

30

Ejemplo 7: efecto de la L-glutamina en la tolerancia a butanol sobre cepas con mutaciones en bombas de eflujo

El efecto de la L-glutamina se comprobó en células de *Pseudomonas putida* BIRD-1 que estaban mutadas en algunas de las bombas de extrusión, concretamente MexEF (PP_3425, PP3426) OprN (PP_3427) y TtgABC (PP_1385, TtgB, PP_1386, TtgA)

35

(ver figuras 4A-E). Las células de *Pseudomonas putida* BIRD-1 (tanto la cepa silvestre como los mutantes en las bombas) se cultivaron en LB, al día siguiente los cultivos se diluyeron hasta alcanzar una densidad óptica de 0,05 y se dejaron crecer hasta una densidad óptica de 0,8 (DO660nm). A continuación, las células silvestres y los mutantes se separaron en alícuotas que se suplementaron con 2% de butanol (v/v) , en presencia y ausencia de glutamina 3mM, la última alícuota se usó como control. El número de células viables en diferentes momentos después de la aplicación de choque se determinó mediante el inóculo de una gota en placa a las diluciones apropiadas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

5

10

Como se muestra en la figura 4A-E, las células que tienen alguna de las bombas de extrusión mutadas muestran mayor viabilidad celular en presencia de L-glutamina en el medio.

15

REIVINDICACIONES

1. Célula microbiana genéticamente modificada para producir glutamina de manera endógena caracterizada porque dicha célula ha sido genéticamente modificada para sobreexpresar el producto codificado por uno o más genes de enzimas con actividad glutamina sintetasa.
5
2. Célula microbiana de acuerdo con la reivindicación 1 donde dichos genes que codifican enzimas con actividad glutamina sintetasa poseen una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 o una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8.
10
3. Célula microbiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque ha sido modificada genéticamente para adicionalmente sobreexpresar una o más bombas de eflujo de tipo RND, preferentemente las bombas TtgABC y MexEF.
15
4. Célula microbiana de acuerdo con la reivindicación 3 caracterizada porque sobreexpresa una o más bombas de eflujo de tipo RND codificadas por las secuencias SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 o por una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12 o SEQ ID NO 13.
20
5. Célula microbiana de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones anteriores que pertenece a uno de los siguientes géneros *Neisseria*, *Spirillum*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Treponema*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Geobacillus*, *Ureobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Nocardia*, *Synechocistis*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Thermoanaerobacterium*, *Zymomonas*, *Candida*, *Chrysosporium*, *Aspergillus*,
25
30

Myceliophthora, Trichoderma, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces o Schizosaccharomyces.

6. Una célula microbiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que pertenece a una de las siguientes especies *Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas stutzeri Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Clostridium thermosaccharolyticum, Clostridium belfantii, Clostridium, saccharoperbutylaceticum, Clostridium pasteurianum, Clostridium tyrobutiricum, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens Zymomonas mobilis, Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, Escherichia coli, Entorococcus faecium Lactobacillus Brevis, Candida arabinofermentans, Candida boidinii, Candida diddensis, Candida fermentans, Chrysosporium lucknowense, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Aspergillus terreus, Aspergillus nidulans, Myceliphthora termopila, Trichoderma reesei, Candida pastoris, Candida shehatae, Candida sonorensis, Candida tropicalis, Hansenula anómala, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces marxianus, Pichia pastoris, Pichia stipitis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bulderi, Saccharomyces barnetti, Saccharomyces exiguus, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces uvarum o Schizosaccharomyces pombe.*

7. Una célula microbiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque es productora de alcoholes

8. Una célula microbiana de acuerdo con la reivindicación 7 caracterizada porque la célula es productora de alcoholes de 2 a 32 carbonos, preferiblemente de 2 a 12 carbonos y más preferiblemente de etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol, decanol, dodecanol o de combinaciones de los mismos.

9. Una célula microbiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque es productora de 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o mezclas de los mismos.
- 5 10. Una construcción génica que comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican una o más enzimas con actividad glutamina sintetasa operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de proteínas en sistemas de expresión.
- 10 11. Una construcción génica de acuerdo con la reivindicación 10 donde la o las secuencias polinucleotídicas que codifican la o las enzimas con actividad glutamina sintetasa son las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8 o una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 1,
15 SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8.
12. Un vector de expresión que comprende una construcción génica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.
- 20 13. Un método para producir células microbianas con tolerancia mejorada a alcoholes que comprende:
- a) Introducir en una célula huésped microbiana una construcción génica de acuerdo a
25 cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 12,
- b) Aislar las células transformadas que hayan incorporado la construcción génica o el vector de expresión en la etapa a).
- 30 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 donde la construcción génica o el vector se introducen en la célula huésped por electroporación.
15. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 donde la célula huésped microbiana pertenece a uno de los siguientes géneros *Neisseria*, *Spirillum*,
35 *Pasteurella*, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*,

Rickettsia, Treponema, Fusobacterium Actinomyces, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Erysipelothrix, Lactobacillus, Listeria, Mycobacterium, Myxococcus, Nocardia, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces, Thermoanaerobacterium, Zymomonas Candida, Chrysosporium, Aspergillus, Myceliophthora, Trichoderma, Hansenula,
 5 *Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces o Schizosaccharomyces.*

16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 donde la célula huésped microbiana pertenece a una de las siguientes especies *Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas stutzeri Clostridium acetobutylicum, Clostridium*
 10 *beijerinckii, Clostridium thermosaccharolyticum, Clostridium belfantii, Clostridium, saccharoperbutylacetonicum, Clostridium pasteurianum, Clostridium tyrobutiricum, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens Zymomonas mobilis, Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, Escherichia coli, Entorococcus faecium, Lactobacillus Brevis, Candida arabinofermentans, Candida boidinii, Candida diddensis, Candida fermentans,*
 15 *Chrysosporium lucknowense, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Aspergillus terreus, Aspergillus nidulans, Myceliphthora termopila, Trichoderma reesei, Candida pastoris, Candida shehatae, Candida sonorensis, Candida tropicalis, Hansenula anómala, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces marxianus, Pichia pastoris, Pichia stipitis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bulderi, Saccharomyces barnetti,*
 20 *Saccharomyces exiguus, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces uvarum o Schizosaccharomyces pombe.*

17. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 donde la célula huésped microbiana es productora de alcoholes.

25

18. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 donde las células microbianas producidas tienen una tolerancia mejorada frente a alcoholes de 2 a 32 carbonos, preferiblemente de 2 a 12 carbonos y más preferiblemente frente a etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol,
 30 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-

35

hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol, decanol, dodecanol o de combinaciones de los mismos.

19. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18 donde la célula
5 microbiana aislada en la etapa b) es opcionalmente transformada mediante:

a) una construcción génica que comprende una o más secuencias
polinucleotídicas que codifican una o más bombas de eflujo de tipo RND,
preferentemente bombas TtgABC o MexEF, operativamente unidas a una o
10 más secuencias de control que dirigen la expresión de polipéptidos en
sistemas de expresión o

b) un vector de expresión que comprende una construcción génica que
comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican una o más
bombas de eflujo de tipo RND, preferentemente bombas TtgABC o MexEF,
15 operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la
expresión de polipéptidos en sistemas de expresión.

20. Un método de acuerdo con la reivindicación 19 donde la o las secuencias
polinucleotídicas que codifican bombas de eflujo de tipo RND se seleccionan entre la SEQ
20 ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 o una secuencia
con un grado de identidad u homología de al menos un 80% con cualquiera de las
secuencias SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12 o SEQ ID NO 13.

21. Una composición microbiológica para mejorar la producción de alcoholes que
25 comprende células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y opcionalmente
al menos un elemento adicional que favorezca la producción de alcoholes.

22. Una composición microbiológica de acuerdo con la reivindicación 21 donde el
elemento adicional que favorece la producción de alcoholes es un medio rico en azúcares
30 fermentables, un microorganismo adicional que actúe sinérgicamente en la producción de
alcoholes, una enzima o enzimas que actúen sinérgicamente en la producción de alcoholes
o una combinación de los mismos.

23. Uso de una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o de una
35 composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22 para mejorar el
rendimiento en la producción de alcoholes.

24. Uso de acuerdo con la reivindicación 23 donde el alcohol producido se selecciona entre etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol, decanol, dodecanol o de combinaciones de los mismos.

25. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24 donde el alcohol es 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o mezclas de los mismos.

15

26. Un procedimiento para producir alcoholes que comprende:

a) incubar la célula de acuerdo con la reivindicación 7 o una composición microbiológica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22, en un medio con azúcares fermentables, para producir alcoholes por fermentación,

20

b) recuperar los alcoholes producidos en la etapa a).

27. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26 donde el azúcar fermentable es glucosa.

25

28. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 27 donde la célula es *Pseudomonas putida* o donde la composición microbiológica comprende *Pseudomonas putida*.

30

29. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 donde el alcohol producido es 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o mezclas de los mismos.

30. Un procedimiento para aumentar la producción de alcoholes en procesos fermentativos que comprende:

35

- a) Incubar una célula microbiana productora de alcoholes en un medio con azúcares fermentables suplementado con glutamina o un precursor de la glutamina,
- b) Recuperar los alcoholes producidos en la etapa a)

5

31. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 30 donde el azúcar fermentable es glucosa.

32. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 o 31 donde la
 10 célula microbiana pertenece a uno de los siguientes géneros *Neisseria*, *Spirillum*,
Pasteurella, *Brucella*, *Yersinia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Escherichia*,
Salmonella, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Acetobacter*,
Aerobacter, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Spirilla*, *Serratia*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Chlamydia*,
 15 *Rickettsia*, *Treponema*, *Fusobacterium* *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*,
Erysipelothrix, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Myxococcus*, *Nocardia*,
Staphylococcus, *Streptococcus* *Streptomyces* *Thermoanaerobacterium*, *Zymomonas*
Candida, *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Myceliophthora*, *Trichoderma*, *Hansenula*,
Kluyveromyces, *Pichia*, *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*.

20 33. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32 donde la
 célula microbiana pertenece a una de las siguientes especies *Pseudomonas putida*,
Pseudomonas fluorescens, *Pseudomonas stutzeri* *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium*
beijerinckii, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium belfantii*, *Clostridium*
saccharoperbutylaceticum, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Bacillus*
 25 *subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacterium*
thermosaccharolyticum, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus Brevis*,
Candida arabinofementans, *Candida boidinii*, *Candida diddensis*, *Candida fermentans*,
Chrysosporium lucknowense, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*,
Aspergillus nidulans, *Myceliophthora termopila*, *Trichoderma reesei*, *Candida pastoris*,
 30 *Candida shehatae*, *Candida sonorensis*, *Candida tropicalis*, *Hansenula anómala*, *Hansenula*
polymorpha, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia pastoris*, *Pichia*
stipitis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bulderi*, *Saccharomyces barnetti*,
Saccharomyces exiguus, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces uvarum* o
Schizosaccharomyces pombe.

35

34. Un procedimiento de acuerdo con la cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33 donde la célula microbiana productora de alcoholes ha sido previamente transformada mediante:

5 a) una construcción génica que comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican una o más bombas de eflujo de tipo RND, preferentemente bombas TtgABC o MexEF, operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de polipéptidos en sistemas de expresión o

10 b) un vector de expresión que comprende una construcción génica que comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican una o más bombas de eflujo de tipo RND, preferentemente bombas TtgABC o MexEF, operativamente unidas a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de polipéptidos en sistemas de expresión.

15 35. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 34 donde la o las secuencias polinucleotídicas que codifican bombas de eflujo de tipo RND se seleccionan entre la SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 o una secuencia con un grado de identidad u homología de al menos un 80% con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12 o SEQ ID NO 13.

20 36. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 35 donde las células son productoras de etanol, propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-2-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-3-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,2-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-1-butanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 2,3-dimetil-2-butanol, 3,3-dimetil-2-butanol, 2-etil-1-butanol, 1-octanol, 2-octanol, 3-octanol, 4-octanol, 3-metil-2-heptanol, 2-metil-2-heptanol, 4-metil-3-heptanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-dimetil-2-hexanol, 2,5-dimetil-2-hexanol, 2,4-dimetil-3-hexanol, 2-propil-1-pentanol, decanol, dodecanol o de combinaciones de los mismos.

35 37. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 36 donde las células son productoras de 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanol o mezclas de los mismos.

38. Un procedimiento de acuerdo la reivindicación 30 donde la célula microbiana productora de alcoholes es una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

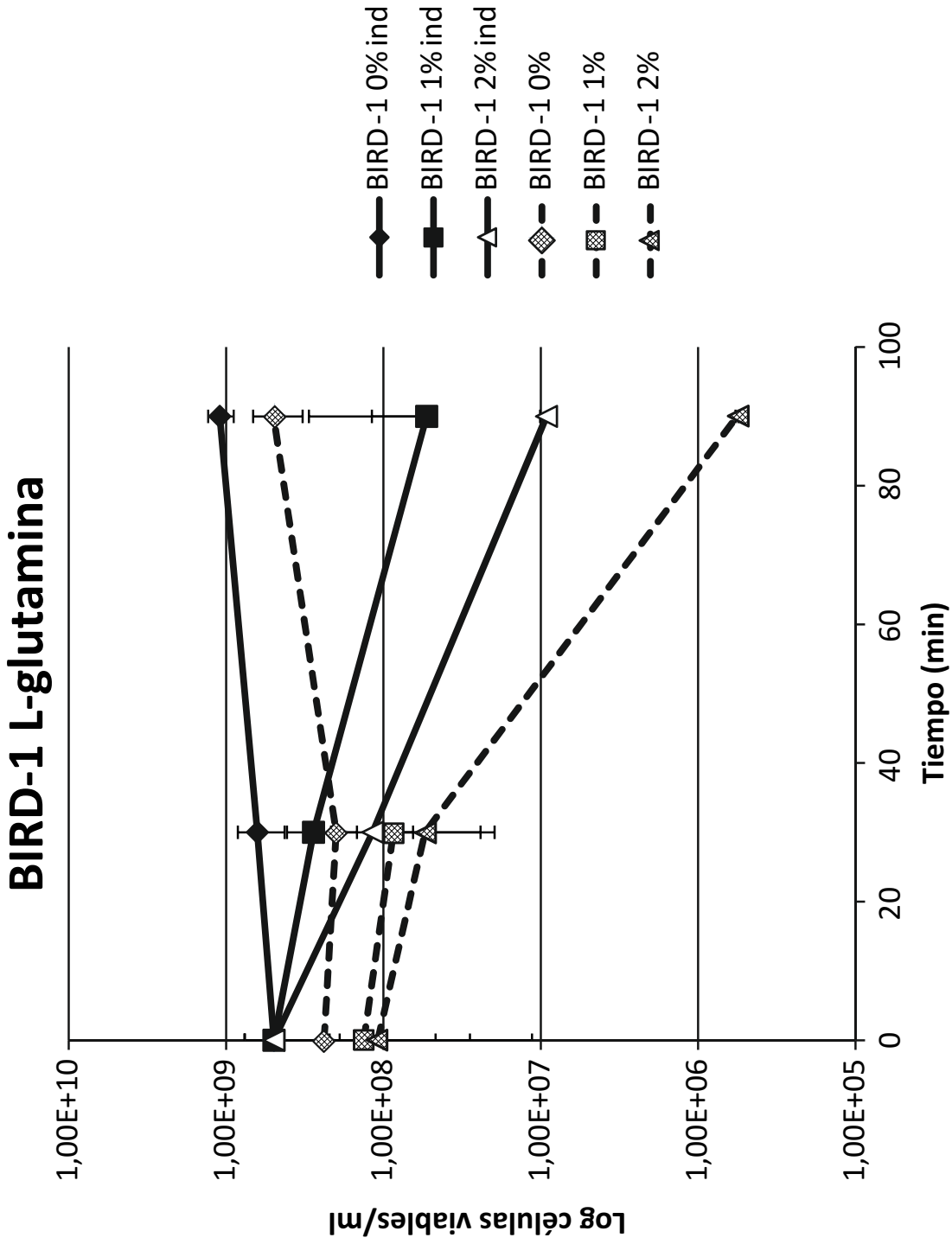


FIG. 1A

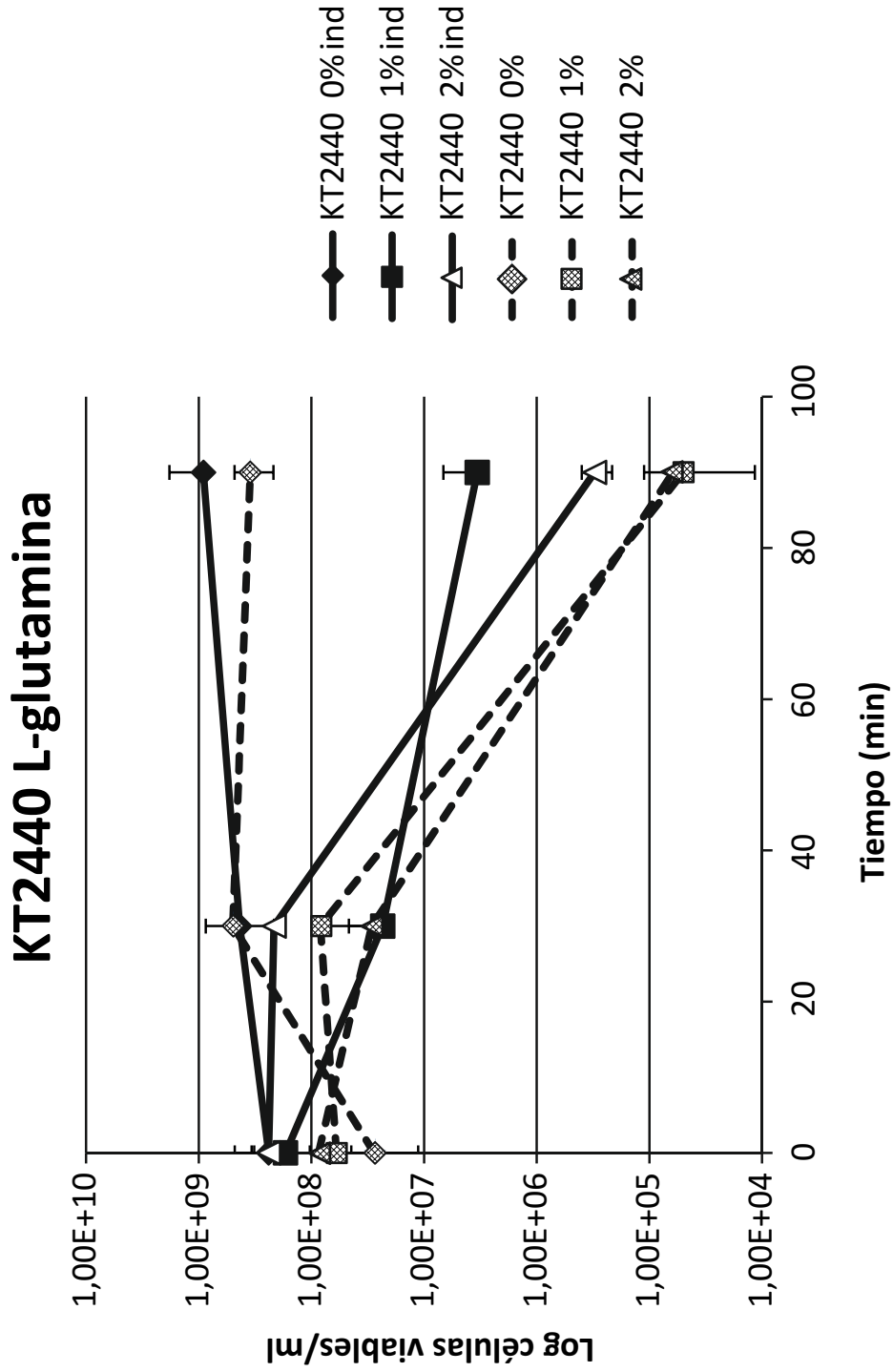


FIG. 1B

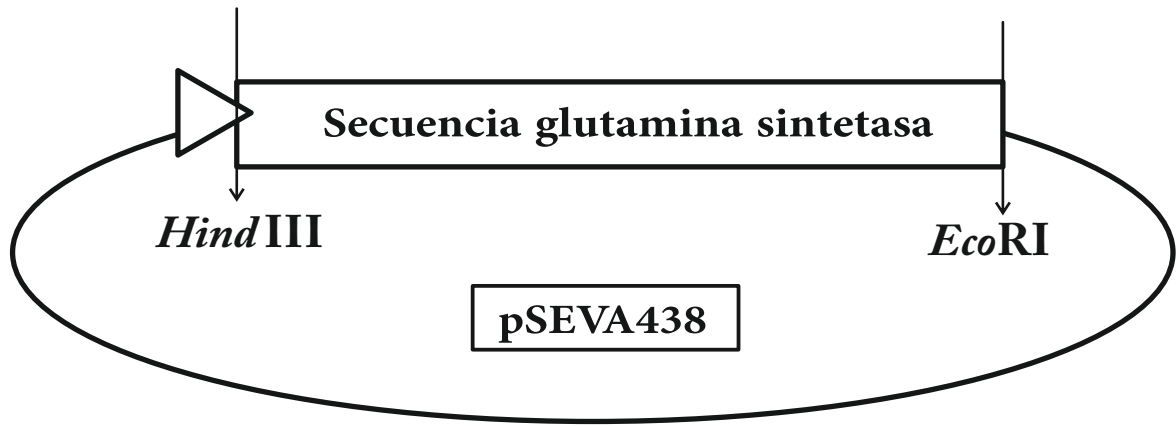


FIG. 2

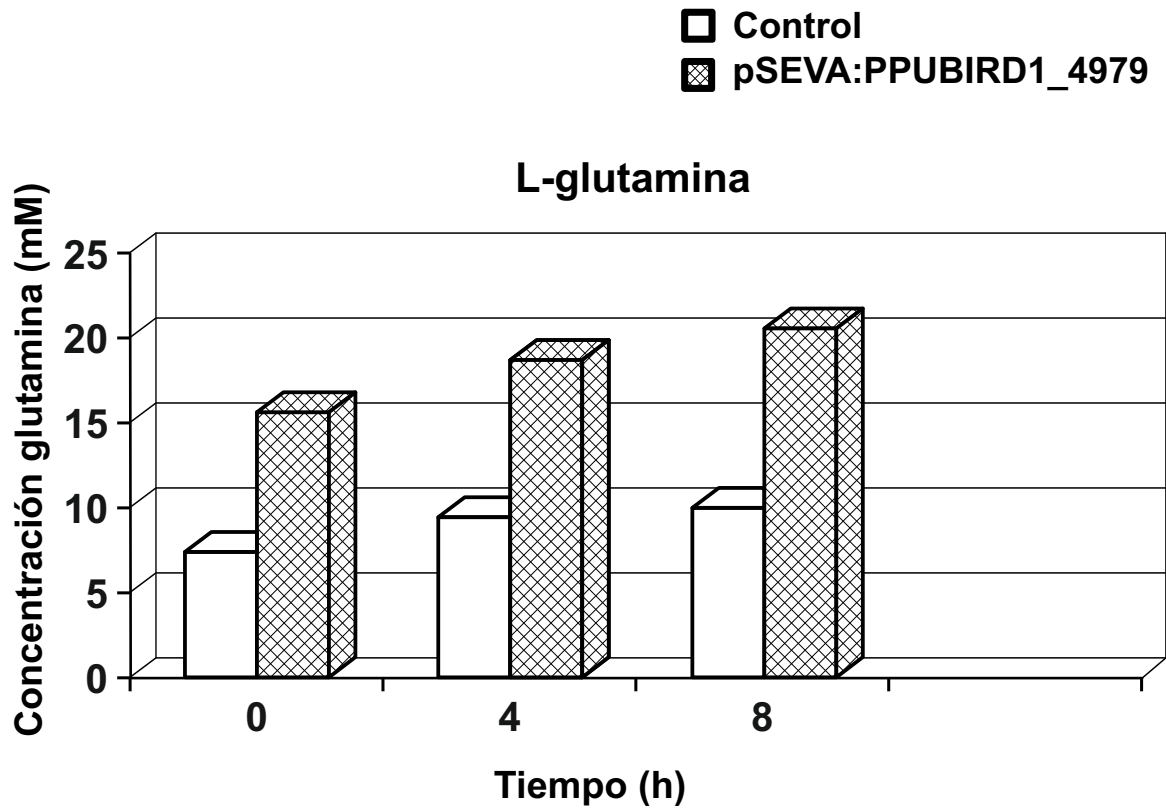


FIG. 3

Cinética de muerte mutante Bomba MexEF

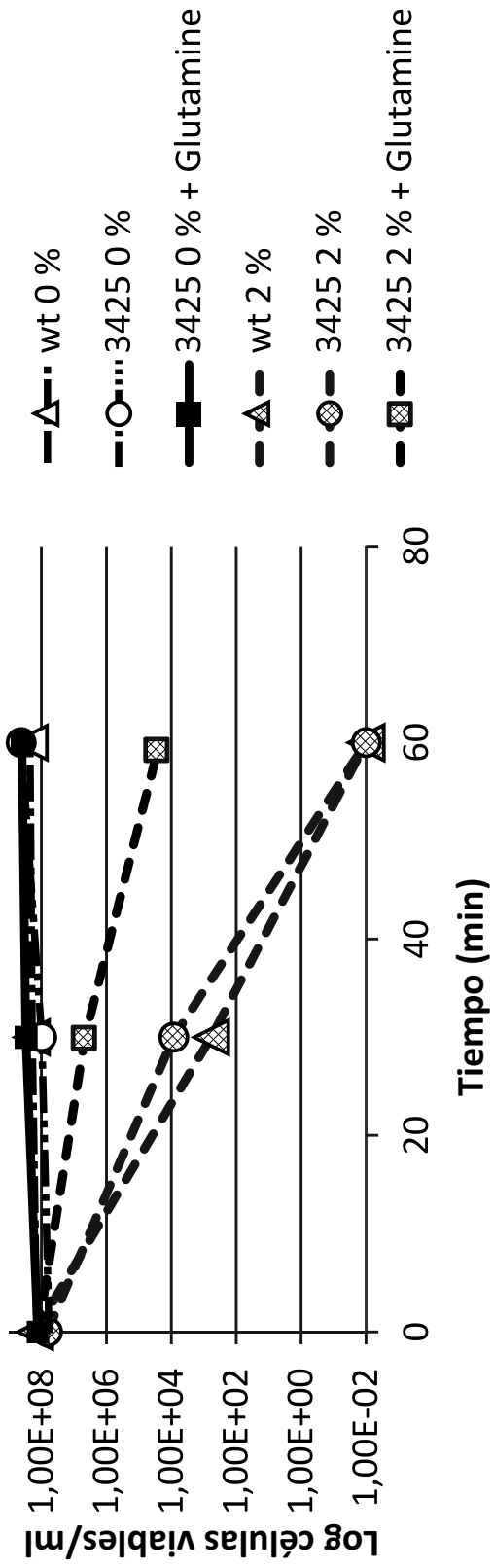


FIG. 4A

Cinética de muerte mutante Bomba MexEF

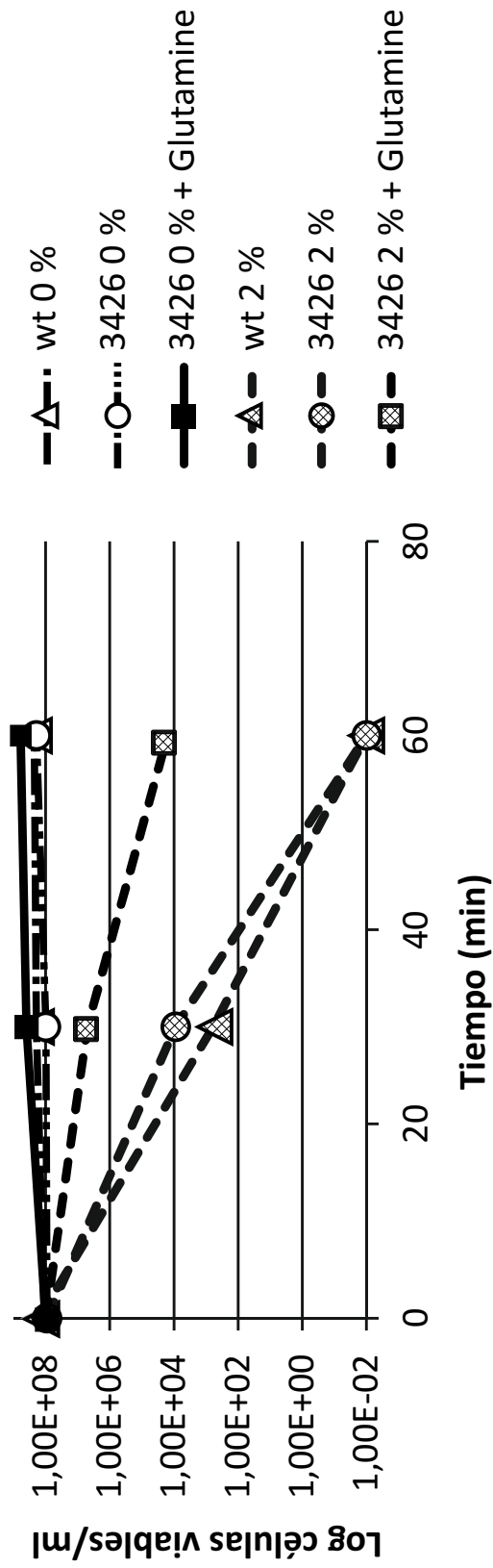


FIG. 4B

Cinética de muerte mutante Bomba OprN

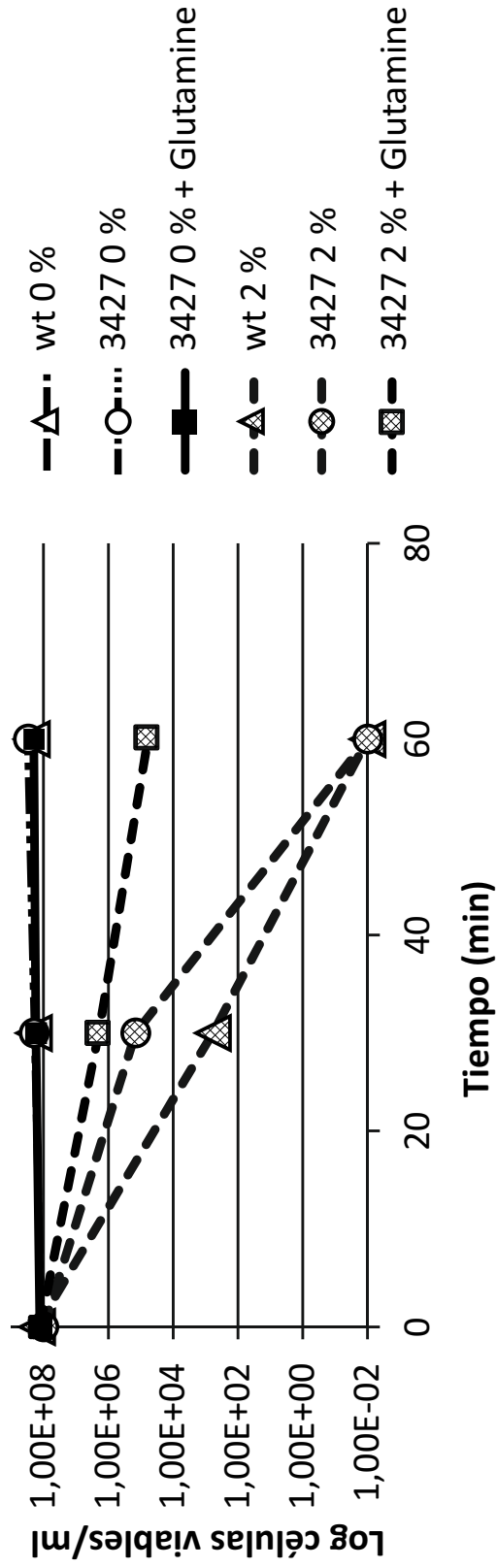


FIG. 4C

Cinética de muerte mutante Bomba TtgB

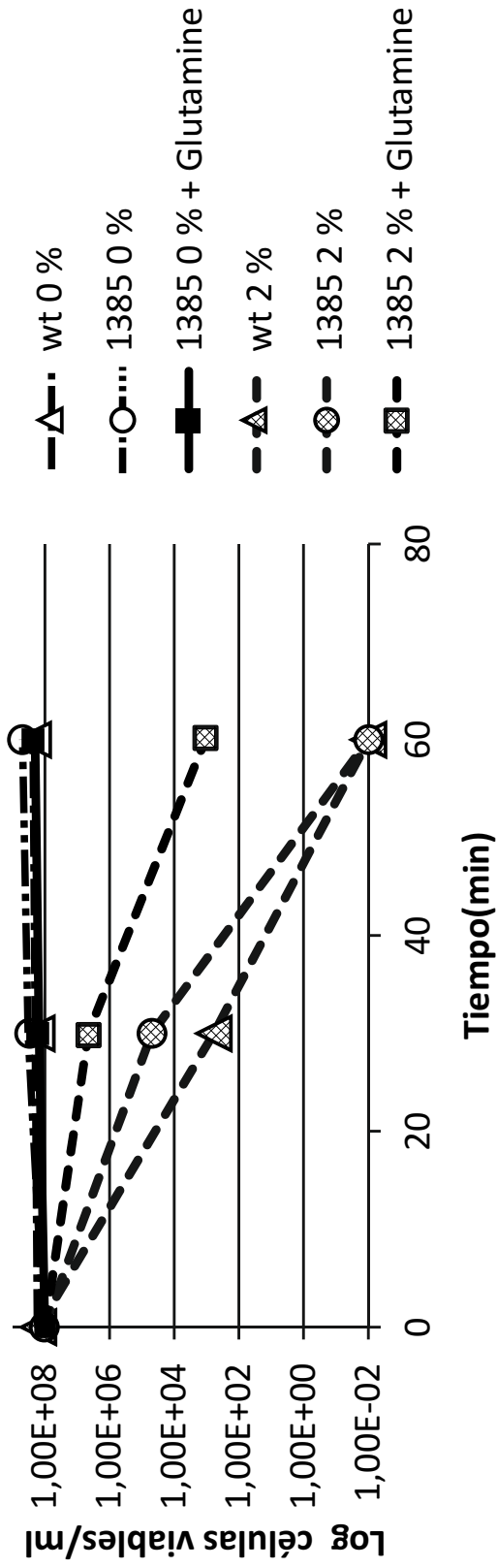


FIG. 4D

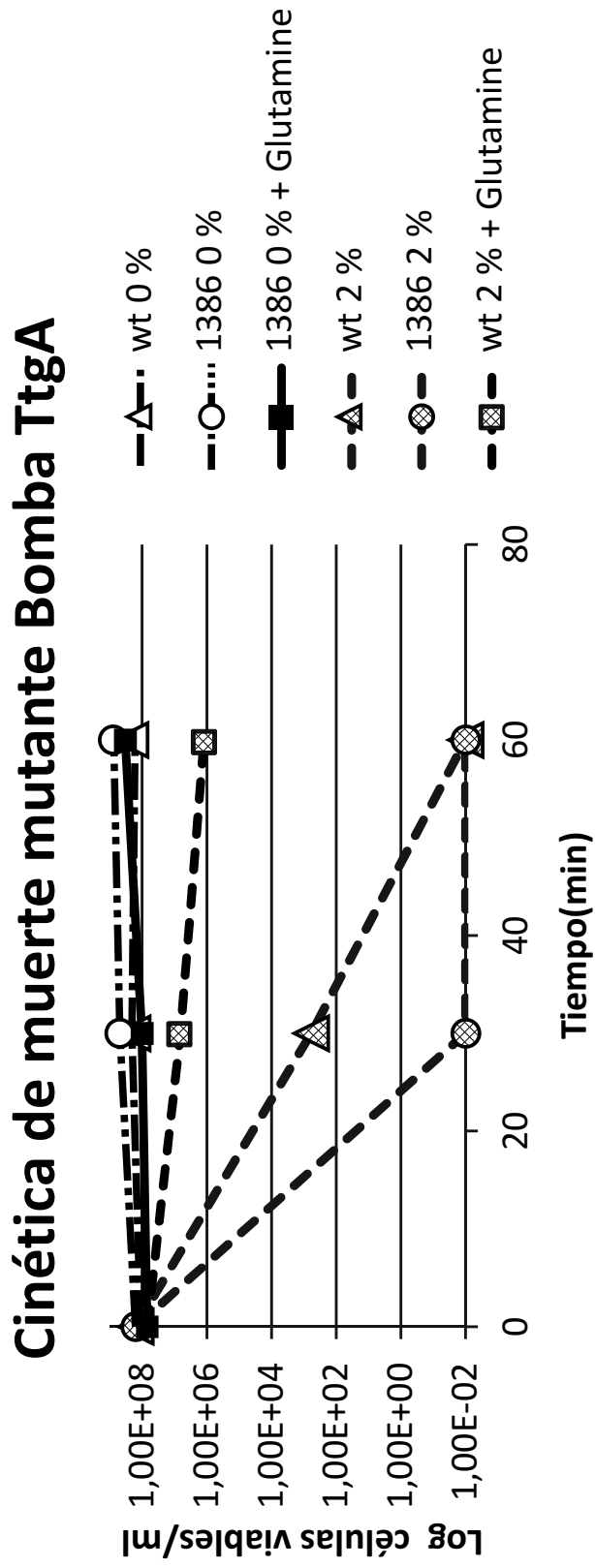


FIG. 4E



②① N.º solicitud: 201530174

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.02.2015

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	NISSEN, T. L., KIELLAND-BRANDT, M.C., NIELSEN, J. et al. Optimization of Ethanol Production in Saccharomyces cerevisiae by Metabolic Engineering (2000), Vol 2, páginas 69-77.	1,2,5-12,21-24, 26-27
X	WANG, Q., MIN, C., YAN, T. et al. Production of glutamine synthetase in Escherichia coli using SUMO fusion partner and application to L-glutamine synthesis. World Journal of Microbiology and Biotechnology. (11. 2011), Vol. 27, páginas 2603-2610.	1,2,5-12,21-22
X	HONG N-N, YANG, G., LI, J. et al. Rapid determination of L-glutamine using Engineered Escherichia coli Overexpressing Glutamine Synthetase. Applied Biochemistry and Biotechnology (2009), Vol 158, nº 2, páginas 398-407.	1,2,5-12,21-22
X	GALLARDO F, FU, J. PING JING Z, et al. La sobreexpresión de Glutamina Sintetasa afecta al crecimiento vegetativo del chopo. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2001).	1,2,5-6,10-12, 21-22
A	CLARK, D.P. The fermentation pathways of Escherichia coli. FEMS Microbiology Reviews. (09.1989), Vol 5, Nº 3, páginas 223-234.	1-38
A	US 2011294183 A1 (DUNLOP MARY J et al.) 01.12.2011, resumen; reivindicaciones.	1-38

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.02.2016

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
1/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/21 (2006.01)

C12N1/15 (2006.01)

C12P7/16 (2006.01)

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

C12N, C12P

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

INVENES, EPODOC, WPIAP, TCM, TXPEA-C, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXTPES, TXPUS, TXPWEOA, BIOSIS, XPESP, XPESP2, NPL, EMBASE, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-4,9,11,13-22,25,28-38	SI
	Reivindicaciones 1,5-8,10,12,23-24,26-27	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 3,4,13-20,25,28-38	SI
	Reivindicaciones 1-2,5-12,21-24,26-27	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	NISSEN, T. L., KIELLAND-BRANDT, M.C., NIELSEN, J. et al. Optimization of Ethanol Production in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by Metabolic Engineering (2000), Vol 2, páginas 69-77.	2000
D02	WANG, Q., MIN, C., YAN, T. et al. Production of glutamine synthetase in <i>Escherichia coli</i> using SUMO fusion partner and application to L-glutamine synthesis. <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> . (11. 2011), Vol. 27, páginas 2603-2610.	11.2011
D03	HONG N-N, YANG, G., LI, J. et al. Rapid determination of L-glutamine using Engineered <i>Escherichia coli</i> Overexpressing Glutamine Synthetase. <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> (2009), Vol 158, nº 2, páginas 398-407.	2009
D04	GALLARDO F, FU, J. PING JING Z, et al. La sobreexpresión de Glutamina Sintetasa afecta al crecimiento vegetativo del chopo. <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> . (2001).	2001
D05	CLARK, D.P. The fermentation pathways of <i>Escherichia coli</i> . <i>FEMS Microbiology Reviews</i> .(09.1989), Vol 5, Nº 3, páginas 223-234.	09.1989
D06	US 2011294183 A1 (DUNLOP MARY J et al.)	01.12.2011

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

La presente solicitud tiene por objeto una célula microbiana genéticamente modificada para sobre expresar glutamina sintetasa (GS), que además puede sobre expresar bombas de eflujo de tipo RND y pueden ser células productoras de alcoholes (Reivindicaciones 1-9).

También es objeto de la presente solicitud una construcción génica que comprende una o más secuencias nucleotídicas que codifican para GS operativamente unidas a una o más secuencias control, (R 10-11) así como un vector que comprende dicha construcción (R.12).

Así mismo, es objeto de la presente solicitud un método para producir células microbianas con tolerancia mejorada a alcoholes que comprende la construcción génica mencionada (R. 13-20), una composición microbiológica que comprende las células microbianas modificadas para sobre expresar GS (R.21-22), el uso de dichas células para mejorar el rendimiento en la producción de alcoholes (R. 23-25), un procedimiento para producir alcoholes que comprende utilizar una célula genéticamente modificada para sobre expresar GS o una composición microbiológica que la contiene (R. 26-29) y un procedimiento para aumentar la producción de alcoholes que comprende incubar una célula microbiológica productora de alcoholes en un medio suplementado con glutamina (Gln) (R. 30-38).

D01 tiene por objeto un estudio sobre la optimización en la producción de etanol en *Saccharomyces cerevisiae*.

D02 tiene por objeto un estudio referente a la producción de GS en *Escherichia coli* y su aplicación a la síntesis de L-glutamina.

D03 tiene por objeto un estudio en el que se analiza la determinación rápida de L-glutamina utilizando una célula de *E. coli*.

D04 tiene por objeto un estudio sobre el efecto de la sobreexpresión de GS en el crecimiento vegetativo del chopo.

D05 tiene por objeto un estudio sobre las rutas de fermentación de *E. coli*, donde se indica que *E.coli* es una bacteria productora de etanol, entre otros.

D06 divulga células microbianas bacterianas modificadas para sobre expresar bombas de eflujo para mejorar la tolerancia frente a diversos compuestos (ver resumen y reivindicaciones).

NOVEDAD (Art. 6.1 de la Ley 11/86)

D01 tiene por objeto un estudio sobre la optimización en la producción de etanol en *S. cerevisiae*. Para llevar a cabo este estudio se generan cepas modificadas genéticamente en las que se delecciona el gen que codifica para glutamato deshidrogenasa y se sobre expresan GS y/o glutamato sintasa.

Para ello se generan plásmidos que contienen secuencias polinucleótídicas que codifican para GS con los que se procede a la transformación de la célula microbiana. Las células microbianas se cultivan en un medio que comprende glucosa (entre otros). En algunas de las cepas que sobre expresan GS (cepa TN19) se observa un aumento en el rendimiento en la producción de etanol del 10% (véase especialmente resumen, página 71 "Overexpression of GLN1, tabla 2, página 76 "discussion").

Por lo tanto, sobre la base de lo divulgado en D01 se considera que el objeto de las reivindicaciones 1, 5-8, 10, 12, 23, 24, 26 y 27 no es nuevo.

D02 tiene por objeto un estudio referente a la producción de GS en *E. coli* y su aplicación a la síntesis de L-glutamina. Se consiguen células de *E. coli* con alta eficiencia en la producción de L-Gln mediante el acoplamiento genético de una GS de *Bacillus subtilis* con un sistema de fermentación alcohólica en levaduras. Para ello se construye un vector de expresión pSUMO-glnA que comprende secuencias nucleotídicas que codifican para GS para posteriormente transformar células de *E.coli* BL21 (véase especialmente resumen, materiales y métodos y figura 1).

Por lo tanto sobre la base de lo divulgado en D02, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1,5, 6, 10, 12 no es nuevo.

D03 tiene por objeto un estudio en el que se analiza la determinación rápida de L-glutamina utilizando una célula de *E. coli* que sobre expresa GS. Se divulgan en este estudio células de *E.coli* BLb1 que sobre expresan en gen de GS de *Bacillus subtilis*. Se crean vectores de expresión que comprende secuencias nucleotídicas que codifican para GS con los que se transforman la células de *E.coli* BL21.

Por lo tanto, sobre la base de lo divulgado en D03 el objeto de las reivindicaciones 1, 5, 6,10 y 12 no es nuevo.

D04 tiene por objeto un estudio sobre el efecto de la sobreexpresión de GS en el crecimiento vegetativo del chopo. Para sobre expresar esta enzima se utiliza una estrategia molecular que consiste en construir un gen quimérico que contiene secuencias nucleotídicas que codifican para GS del pino baja la dirección del promotor 35S del virus del mosaico de la flor. El gen quimérico se transfiere a un vector pBin19 para la transformación de un clon de híbrido de chopo, mediante la infección de *Agrobacterium tumefaciens*.

Por lo tanto, sobre la base de lo divulgado en D04 el objeto de las reivindicaciones 1, 5, 10 y 12, no es nuevo en el sentido del artículo 6.1 de la Ley de patentes 11/86.

En conclusión, sobre la base de lo divulgado en D01-D04 se considera que el objeto de las reivindicaciones 1, 5-8, 10, 12, 23, 24, 26 y 27 no es nuevo, mientras que el objeto de las reivindicaciones 2-4, 9, 11, 13-22, 25, 28-38 es nuevo en el sentido del artículo 6.1 de la Ley de patentes 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 de la Ley de patentes 11/86)**Reivindicaciones 2 y 11**

Las secuencias SEQ ID NO 1-8 son conocidas ya en el estado de la técnica como secuencias que codifican para glutamina sintasa. Por lo tanto, se considera un experto en la materia, podría intentar utilizar estas secuencias con una expectativa razonable de éxito para obtener células microbianas que sobre expresen GS o construcciones génicas que las incluyan como las ya divulgadas en D01-D03. Por lo tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 2 y 11 no implicaría actividad inventiva para el experto en la materia.

Reivindicaciones 7-8

No se menciona en D02 y D03 que las cepas de *E. coli* sean productoras de alcohol. Sin embargo, es conocido en el estado de la técnica que *E.coli* puede producir etanol (véase D05).

Reivindicación 9

La modificación de células microbianas para sobre expresar GS queda anticipado en D01-D04. En estos documentos se modifican distintas cepas de muy diversos géneros para sobre expresar esta enzima con diferentes fines. Un experto en la materia podría por tanto intentar modificar otras células microbianas de distintos géneros que produzcan butanol de forma natural para sobre expresar GS con una probabilidad razonable de éxito. Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicación 9 no implicaría actividad inventiva para el experto en la materia.

Reivindicaciones 21-22

Sobre la base de lo divulgado en D01-D04, se considera que la composición microbiológica que comprende una célula microbiana modificada genéticamente para sobre expresar GS no implicaría actividad inventiva para el experto en la materia.

Por lo tanto, sobre la base de lo divulgado en D01-D04 se considera que el objeto de las reivindicaciones 2, 7-9, 11, 21 y 22 no implicarían actividad inventiva para el experto en la materia, mientras que el objeto de las reivindicaciones 3-4, 13-20, 25, 28-38 sí implicaría actividad inventiva para el experto en la materia en el sentido del artículo 8.1 de la Ley de patentes 11/86