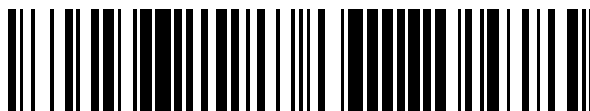


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 637**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/04 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2011 PCT/JP2011/055142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11111638**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2011 E 11753297 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2546331**

54 Título: **Bacteria productora de alcohol isopropílico altamente productora**

30 Prioridad:

09.03.2010 JP 2010052249

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

11.02.2020

73 Titular/es:

**MITSUI CHEMICALS, INC. (100.0%)
5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome, Minato-ku
Tokyo 105-7117, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUMOTO, YOSHIKO;
HIRANO, JUNICHIRO;
MORISHIGE, TAKASHI;
SHIRAI, TOMOKAZU;
TAKAHASHI, HITOSHI;
AMANO, KOH;
TAKEBAYASHI, NOZOMI;
WADA, MITSUFUMI;
SHIMIZU, HIROSHI;
FURUSAWA, CHIKARA y
HIRASAWA, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 741 637 T3

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

DESCRIPCIÓN

Bacteria productora de alcohol isopropílico altamente productora

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una bacteria productora de alcohol isopropílico y a un método de producción de alcohol isopropílico usando la misma.

10 **Técnica anterior**

El propileno es un material de partida básico importante de resinas sintéticas tales como polipropileno y productos petroquímicos y se usa en una amplia variedad de productos tales como para choques para automóviles, envases para alimentos, películas e instrumentos médicos.

15 El alcohol isopropílico producido a partir de un material de partida derivado de planta se puede convertir en propileno mediante un proceso de deshidratación. Por tanto, el alcohol isopropílico es prometedor como material de partida para propileno de carbono neutro. Actualmente, el Protocolo de Kioto exige que los países desarrollados reduzcan en conjunto las emisiones de dióxido de carbono un 5 % en comparación con los niveles de 1990 en el periodo de 2008 a 2012. Por tanto, el propileno de carbono neutro es extremadamente importante en el entorno global debido a su versatilidad.

20 Ya se conocen bacterias que asimilan un material de partida derivado de planta para producir alcohol isopropílico. Por ejemplo, el folleto del documento de patente WO2009/008377 desvela una bacteria modificada para producir alcohol isopropílico a partir de glucosa como material de partida y describió que la bacteria tiene excelentes propiedades como biocatalizador para producción industrial debido a su alta selectividad de alcohol isopropílico.

25 En una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, puesto que el material de partida para el alcohol isopropílico es glucosa, un gran número de compuestos obtenidos por glucólisis y catabolismo pueden todos ser subproductos. Por otra parte, puesto que los compuestos pueden ser sustancias esenciales para el crecimiento de *Escherichia coli*, es imposible suprimir completamente la cantidad de glucosa consumida por las reacciones secundarias. Por consiguiente, para aumentar la velocidad de producción de alcohol isopropílico mientras que se minimizan los subproductos, es necesario maximizar el flujo metabólico hacia alcohol isopropílico mientras que se consideran todas las reacciones metabólicas que ocurren en *Escherichia coli*, y se han propuesto diversas técnicas desde el punto de vista de la actividad biológica y la producción de sustancias.

30 Por ejemplo, el folleto del documento de patente WO2009/008377 desvela una bacteria productora de alcohol isopropílico en la que se introducen genes respectivos de acetoacetato descarboxilasa, alcohol isopropílico deshidrogenasa, CoA transferasa y tiolasa para permitir que se produzca alcohol isopropílico a partir de un material de partida derivado de planta. Se describe que la bacteria productora de alcohol isopropílico puede alcanzar una velocidad de producción de 0,6 g/l/h y una cantidad de acumulación de 28,4 g/l.

35 El folleto del documento de patente WO2009/049274 y Appl. Environ. Biotechnol., 73(24), pp. 7814-7818, (2007) desvelan *Escherichia coli* en la que genes respectivos de acetil-CoA acetiltransferasa, acetoacetil CoA transferasa, acetoacetato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa secundaria se introducen para producir alcohol isopropílico. Se describe que las bacterias pueden alcanzar una velocidad de producción de 0,4 g/l/h, un rendimiento de 43,5 % y una cantidad de acumulación de 4,9 g/l.

40 El folleto del documento de patente WO2009/023582 desvela *Escherichia coli* en la que se introducen genes respectivos de acetoacetato carboxilasa, alcohol isopropílico deshidrogenasa, acetil-CoA:acetato CoA-transferasa y acetil-CoA acetil transferasa para producir alcohol isopropílico. Se describe que la bacteria puede alcanzar una cantidad de acumulación de 9,7 g/l.

45 Appl. Microbiol. Biotechnol., 77(6), pp. 1219-1224, (2008) desvela *Escherichia coli* en la que se introducen genes respectivos de tiolasa, CoA-transferasa, acetoacetato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa primaria-secundaria para producir alcohol isopropílico. Se describe que la bacteria puede alcanzar una velocidad de producción de 0,6 g/l/h, un rendimiento de 51 % y una cantidad de acumulación de 13,6 g/l.

50 El folleto del documento de patente WO2009/103026 desvela *Escherichia coli* en la que se introducen genes respectivos de acetoacetato descarboxilasa, acetil-CoA:acetato CoA transferasa, acetil-CoA acetil transferasa y alcohol isopropílico deshidrogenasa para permitir la producción de alcohol isopropílico. Se describe que se espera que la bacteria tenga la capacidad para lograr un rendimiento de 50 %, una velocidad de producción de 0,4 g/l/h y una producción definitiva de 14 g/l.

55 El folleto del documento de patente WO2009/247217 desvela *Escherichia coli* en la que se introducen genes respectivos de acetoacetato descarboxilasa, CoA transferasa, tiolasa y 2-propil alcohol deshidrogenasa para permitir

la producción de alcohol isopropílico. Se describe que la bacteria puede alcanzar una producción definitiva de 2 g/l.

Aquí, la alcohol isopropílico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa secundaria, alcohol deshidrogenasa primaria-secundaria y 2-propil alcohol deshidrogenasa son enzimas que tienen diferentes nombres pero catalizan la misma reacción. La CoA transferasa, acetoacetil CoA transferasa, acetil CoA:acetato CoA transferasa y CoA-transferasa son enzimas que tienen diferentes nombres pero catalizan la misma reacción. Además, la acetoacetato descarboxilasa y la acetoacetato descarboxilasa son enzimas que tienen diferentes nombres pero catalizan la misma reacción, y la tiolasa y acetil CoA acetil transferasa son enzimas que tienen diferentes nombres pero catalizan la misma reacción. Por consiguiente, aunque varía la productividad de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de los documentos anteriormente descritos, las enzimas usadas para producir alcohol isopropílico son equivalentes a las cuatro enzimas - acetoacetato descarboxilasa, alcohol isopropílico deshidrogenasa, CoA transferasa y tiolasa - descritas en el folleto del documento de patente WO2009/008377. Para fines tales como mejora de la productividad y rendimiento, se han estudiado convencionalmente las cuatro enzimas.

Por otra parte, se conoce un método de delección de una enzima malato deshidrogenasa que posee un microorganismo como un método de mejora del rendimiento y la productividad en la producción de sustancias por el microorganismo.

Por ejemplo, el folleto del documento de patente WO20091023493 describe que, en la producción de 1,4-butanodiol por *Escherichia coli*, el rendimiento es incrementado por la perturbación de un gen de malato deshidrogenasa que posee la *Escherichia coli* o por alteración simultánea de un gen de malato deshidrogenasa y un gen de transhidrogenasa que posee *Escherichia coli*.

Además, el folleto del documento de patente WO2009/012210 describe que, en la producción de etanol por *Escherichia coli*, el rendimiento es incrementado por la perturbación simultánea de un gen de malato deshidrogenasa y un gen de D-lactato deshidrogenasa que posee la *Escherichia coli*.

Además, el folleto del documento de patente WO2009/111672 describe que, en la producción de dodecanol por levadura, la productividad mejora eficazmente perturbando simultáneamente el gen de acetaldehído-CoA deshidrogenasa, un gen de D-lactato deshidrogenasa y un gen de malato deshidrogenasa que posee levadura.

Sumario de la invención

Problema a resolver por la invención

Sin embargo, no se considera que ninguna de las bacterias anteriormente descritas capaces de producir alcohol isopropílico tenga capacidad de producción suficiente. Así, un problema importante a resolver ha sido cómo mejorar el rendimiento y la velocidad de la producción de alcohol isopropílico por una bacteria productora de alcohol isopropílico.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una *Escherichia coli* capaz de producir alcohol isopropílico con alta velocidad y con alto rendimiento y un método de producción de alcohol isopropílico usando la *Escherichia coli*.

Medios para resolver el problema

La presente invención se ha llevado a cabo en vista de las circunstancias anteriormente descritas, y una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de la presente invención y un método de producción de alcohol isopropílico de la presente invención son del siguiente modo:

[1] Una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico equipada con un sistema de producción de alcohol isopropílico, que tiene al menos una actividad enzimática potenciada seleccionada del grupo que consiste en una actividad de malato deshidrogenasa potenciada, una actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (AB-específica) potenciadas y una actividad de tiolasa potenciada.

[2] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], en donde la actividad enzimática potenciada incluye la actividad de malato deshidrogenasa potenciada.

[3] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], en donde la actividad enzimática potenciada incluye la actividad de malato deshidrogenasa potenciada y la actividad de tiolasa potenciada.

[4] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], en donde la actividad enzimática potenciada incluye la actividad de malato deshidrogenasa potenciada y la actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) potenciada.

[5] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según [1], en donde la actividad enzimática potenciada incluye la actividad de malato deshidrogenasa potenciada, la actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) potenciada y la actividad de tiolasa potenciada.

[6] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según uno cualquiera de [1] a [5], en donde la actividad enzimática potenciada deriva de al menos una de potenciamiento por un gen de enzima introducido desde fuera de una célula de *Escherichia coli* y el potenciamiento por expresión potenciada de un gen de enzima en la célula

de *Escherichia coli*.

[7] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según uno cualquiera de [1] a [6], en donde la actividad enzimática potenciada deriva de al menos una de potenciamiento en el genoma de una *Escherichia coli* hospedadora y potenciamiento por introducción de plásmido.

[8] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según uno cualquiera de [1] a [7], en donde la actividad enzimática potenciada deriva de un gen o genes derivados de una bacteria o bacterias del género *Escherichia* y que codifica la enzima o enzimas.

[9] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según uno cualquiera de [1] a [8], en donde el sistema de producción de alcohol isopropílico se construye por genes respectivos de acetoacetato descarboxilasa, alcohol isopropílico deshidrogenasa, CoA transferasa y tiolasa.

[10] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según uno cualquiera de [1] a [8], en donde el sistema de producción de alcohol isopropílico se construye por genes de enzima respectivos de la acetoacetato descarboxilasa, la alcohol isopropílico deshidrogenasa, la CoA transferasa y la tiolasa, y cada uno de los genes de enzima deriva independientemente de al menos un procarionte seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*.

[11] La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según uno cualquiera de [1] a [8], en donde la actividad de acetoacetato descarboxilasa deriva de un gen que deriva de *Clostridium acetobutylicum* y codifica la enzima; la actividad de alcohol isopropílico deshidrogenasa deriva de un gen que deriva de *Clostridium beijerinckii* y codifica la enzima; y la actividad de CoA transferasa, la actividad de tiolasa, la actividad de malato deshidrogenasa y la actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) derivan de genes que derivan de *Escherichia coli* y codifican las enzimas respectivas.

[12] Un método de producción de alcohol isopropílico que incluye producir alcohol isopropílico a partir de un material de partida derivado de planta usando *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según uno cualquiera de [1] a [11].

Breve descripción de dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que compara las capacidades productoras de IPA de diversos tipos de *Escherichia coli* productora de IPA según el Experimento 1 de evaluación de la presente invención.

Descripción de realizaciones

Una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de la presente invención es un sistema de producción de alcohol de isopropílico *Escherichia coli*, que está equipado con un sistema de producción de alcohol isopropílico e incluye al menos una actividad enzimática potenciada seleccionada del grupo que consiste en una actividad de malato deshidrogenasa potenciada, una actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) potenciada y una actividad de tiolasa potenciada.

La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de la presente invención tiene al menos una actividad enzimática potenciada de las tres actividades enzimáticas anteriormente mencionadas y, por tanto, permite la producción rápida y de alto rendimiento de alcohol isopropílico.

Específicamente, como resultado de diversas investigaciones para mejorar una actividad del sistema de producción de alcohol isopropílico, la presente invención ha encontrado que se incrementa la velocidad de producción de alcohol isopropílico como producto obtenido por la *Escherichia coli* y mejora su rendimiento de producción potenciando al menos una cualquiera de una actividad de malato deshidrogenasa, que es una de las enzimas presentes en la vía metabólica de la glucosa, una actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB), que es una enzima implicada en la oxidación-reducción de NAD y NADP⁺, y una actividad de tiolasa, que es una enzima del sistema de producción de alcohol isopropílico,

En la presente invención, la expresión: "potenciamiento" de "actividad" o "capacidad" significa ampliamente que las actividades enzimáticas respectivas en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico después del potenciamiento son superiores a las de antes de la potenciación.

El método de potenciamiento está específicamente limitado, en tanto que se potencien las actividades de las enzimas respectivas originalmente presentes en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, y ejemplos del método de potenciamiento incluyen el potenciamiento por un gen de enzima introducido desde fuera de la célula bacteriana, potenciamiento por expresión potenciada de un gen de enzima en la célula bacteriana, o una combinación de los mismos.

Los ejemplos específicos de la potenciación por un gen de enzima introducido desde fuera de la célula bacteriana incluyen: introducir un gen que codifica una enzima más activa que una enzima derivada de hospedador desde fuera de la célula bacteriana de la bacteria hospedadora en la célula bacteriana para añadir la actividad enzimática del gen de enzima introducido, o para sustituir la actividad enzimática del gen de enzima derivado de hospedador con la actividad enzimática del gen de enzima introducido; aumentar el número de genes de enzima derivados de hospedador o enzima genes desde fuera de la célula bacteriana hasta dos o más; o cualquier combinación de los

mismos.

Los ejemplos específicos de la potenciación por expresión potenciada de un gen de enzima en la célula bacteriana incluyen introducir una secuencia de bases que potencia la expresión del gen de enzima desde fuera de la célula bacteriana de la bacteria hospedadora en la célula bacteriana; sustituir el promotor del gen de enzima que posee la bacteria hospedadora en su genoma con otro promotor para potenciar la expresión del gen de enzima; o cualquier combinación de los mismos.

En la presente invención, el término "hospedador" significa una *Escherichia coli* que llegará a ser la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de la presente invención como resultado de la introducción de uno o más genes desde fuera de la célula bacteriana.

Además, el alcance del término "proceso" en la presente invención incluye un proceso independiente, así como un proceso que no puede ser claramente distinguido de otro proceso, pero logra un efecto previsto del proceso.

En la presente memoria descriptiva, el intervalo de valores numéricos descrito usando "a" indica un intervalo que incluye valores numéricos descritos antes y después de "a" como un valor mínimo y un valor máximo, respectivamente.

En lo sucesivo, se describirá la presente invención.

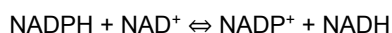
La malato deshidrogenasa en la presente invención se clasifica con el número de código de enzimas: 1.1.1.40 basado en el Informe de la Comisión de Enzimas, Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B) y es un nombre genérico de enzimas que catalizan una reacción de producción de ácido pirúvico y CO₂ a partir de ácido L-málico.

Los ejemplos de la malato deshidrogenasa incluyen los derivados de un protozoo del género *Trichomonas* tal como *Trichomonas vaginalis*, una bacteria *Rhizobium* tal como *Rhizobium meliloti*, una bacteria *Sulfolobus* tal como *Sulfolobus fataricus*, una bacteria del género *Corynebacterium* tal como *Corynebacterium glutamicum*, una bacteria del género *Escherichia* tal como *Escherichia coli* y una bacteria del género *Sinorhizobium* tal como *Sinorhizobium meliloti*.

Como gen de la malato deshidrogenasa usada en la presente invención, se pueden usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la malato deshidrogenasa de cualquiera de los organismos fuente anteriormente mencionados o una secuencia de ADN sintético sintetizada basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos adecuados incluyen los derivados de procariotas tales como bacterias *Rhizobium*, bacterias *Sulfolobus*, bacterias del género *Corynebacterium*, bacterias del género *Escherichia* y bacterias del género *Sinorhizobium*. Es particularmente preferible el ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Escherichia coli*.

Hasta la fecha, no ha habido ningún informe de que se potenciaron la actividad de malato deshidrogenasa y la expresión de un gen que codifica esta enzima con la finalidad de mejorar la producción de una sustancia útil. Más bien, se cree generalmente que, en la producción de una sustancia usando un microorganismo, la mejora de la productividad y el rendimiento requiere la deleción de la actividad de malato deshidrogenasa o un gen que codifica esta enzima presente en el microorganismo, como se describen en los documentos de patente WO2009/023493, WO2009/012210 y WO2009/111672. Así, fue completamente inesperada la mejora en la velocidad y el rendimiento de la producción de alcohol isopropílico potenciando la actividad de malato deshidrogenasa.

La NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) en la presente invención se clasifica con el número de código de enzimas: 1.6.1.2 basado en el Informe de la Comisión de Enzimas, Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B) y es un nombre genérico de enzimas que catalizan una reacción del siguiente modo:



Aquí, NADP es nicotinamida adenina dinucleótido fosfato y NADPH representa una forma reducida del mismo. Además, NAD es nicotinamida adenina dinucleótido y NADH representa una forma reducida del mismo.

Los ejemplos de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) incluyen los derivados de bacterias del género *Escherichia* tal como *Escherichia coli*, bacterias del género *Rhodobacter* tales como *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter capsulatus*, y bacterias del género *Klebsiella* tal como *Klebsiella pneumoniae*.

Como gen de la NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) usada en la presente invención, se pueden usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) obtenido de cualquiera de los organismos fuente anteriormente mencionados o una secuencia de ADN sintético sintetizada basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos adecuados de las mismos incluyen los derivados de procariotas tales como bacterias del género *Escherichia*, bacterias del género *Rhodobacter* y bacterias del género *Klebsiella*. Por ejemplo, se puede ejemplificar un ADN que tiene la secuencia de bases del gen de

Escherichia coli. Es particularmente preferible un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Escherichia coli*.

5 La tiolasa en la presente invención se clasifica con el número de código de enzimas: 2.3.1.9 basado en el Informe de la Comisión de Enzimas, Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B) y es un nombre genérico de enzimas que catalizan una reacción de producción de acetoacetil CoA a partir de acetil CoA.

10 Los ejemplos de dicha tiolasa incluyen los derivados de bacterias del género *Clostridium* tales como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, bacterias del género *Escherichia* tales como *Escherichia coli*, bacterias de especies de *Halobacterium*, bacterias del género *Zoogloea* tales como *Zoogloea ramigera*, especies de *Rhizobium*, bacterias del género *Bradyrhizobium* tales como *Bradyrhizobium japonicum*, bacterias del género *Candida* tales como *Candida tropicalis*, bacterias del género *Caulobacter* tal como *Caulobacter crescentus*, bacterias del género *Streptomyces* tales como *Streptomyces collinus* y bacterias del género *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis*.

15 Como gen de la tiolasa usado en la presente invención, se puede usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica tiolasa obtenida de cualquiera de los organismos fuente anteriormente mencionados o una secuencia de ADN sintético sintetizada basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos adecuados de los mismos incluyen ADNs que tienen las secuencias de bases de los genes derivados de bacterias del género *Clostridium* tal como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, bacterias del género *Escherichia* tal como *Escherichia coli*, bacterias de *Halobacterium* sp., bacterias del género *Zoogloea* tal como *Zoogloea ramigera*, bacterias de *Rhizobium* sp., bacterias del género *Bradyrhizobium* tal como *Bradyrhizobium japonicum*, bacterias del género *Candida* tal como *Candida tropicalis*, bacterias del género *Caulobacter* tal como *Caulobacter crescentus*, bacterias del género *Streptomyces* tales como *Streptomyces collinus* y bacterias del género *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis*. Los ejemplos más adecuados incluyen los derivados de procariotas tales como bacterias del género *Clostridium* o bacterias del género *Escherichia*. Es particularmente preferible un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli*.

30 La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de la presente invención tiene al menos una actividad enzimática de entre las actividades enzimáticas potenciadas obtenidas potenciando respectivamente las tres actividades enzimáticas anteriormente descritas. Entre las tres actividades enzimáticas potenciadas, la actividad de tiolasa también es una de las enzimas que forman el sistema de producción de alcohol isopropílico, que se describirá a continuación. Así, en un caso en el que la actividad de tiolasa se incluya como actividad enzimática diana potenciada en la *Escherichia coli*, la actividad de tiolasa necesita ser adicionalmente potenciada. Los ejemplos de potenciación incluyen potenciamiento de la expresión de un gen que codifica tiolasa en un plásmido o el genoma, un aumento del número de copias del gen de tiolasa, y cualquier combinación de los mismos, como se ha descrito anteriormente.

40 La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en la presente invención es una *Escherichia coli* equipada con el sistema de producción de alcohol isopropílico, y se refiere a una *Escherichia coli* que tiene una capacidad de producción de alcohol isopropílico que se ha introducido o modificado por recombinación genética. Dicho sistema de producción de alcohol isopropílico puede ser cualquier sistema que provoque que la *Escherichia coli* de interés produzca alcohol isopropílico.

45 Un ejemplo preferible es el potenciamiento de una actividad enzimática implicada en la producción de alcohol isopropílico. En la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de la presente invención, más preferentemente, se confieren cuatro actividades enzimáticas - una actividad de acetoacético ácido descarboxilasa, una actividad de alcohol isopropílico deshidrogenasa, una actividad de CoA transferasa, y la actividad de tiolasa anteriormente descrita - desde fuera de la célula bacteriana, o se potencia la expresión de las cuatro actividades enzimáticas en la célula bacteriana, o se llevan a cabo ambos de estos.

55 En la presente invención, el alcance de la expresión "por recombinación genética" engloba todos los casos en los que cualquier cambio en una secuencia de bases ocurre debido a la inserción de otro ADN en la secuencia de bases de un gen innato, una sustitución o delección de una cierta parte del gen, o cualquiera de combinaciones de las mismas, y engloba, por ejemplo, un cambio en una secuencia de bases que ocurre como resultado de mutación.

60 La acetoacetato descarboxilasa en la presente invención se clasifica con el número de código de enzimas: 4.1.1.4 basado en el Informe de la Comisión de Enzimas, Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B) y es un nombre genérico de enzimas que catalizan una reacción de producción de acetona a partir de ácido acetoacético.

Los ejemplos de la acetoacetato descarboxilasa incluyen los derivados de bacterias del género *Clostridium* tales como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, y bacterias del género *Bacillus* tales como *Bacillus polymyxa*.

65 Un gen de acetoacetato descarboxilasa a introducir en la bacteria hospedadora de la presente invención puede ser un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica acetoacetato descarboxilasa obtenido a partir de

5 cualquiera de los organismos fuente anteriormente descritos o una secuencia de ADN sintético sintetizada basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos adecuados de los mismos incluyen los derivados de bacterias del género *Clostridium* o bacterias del género *Bacillus*, y un ejemplo es un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum* o *Bacillus polymyxa*. Es particularmente preferible un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum*.

10 La alcohol isopropílico deshidrogenasa en la presente invención se clasifica con el número de código de enzimas: 1.1.1.80 basado en el Informe de la Comisión de Enzimas, Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B) y es un nombre genérico de enzimas que catalizan una reacción de producción de alcohol isopropílico a partir de acetona.

15 Los ejemplos de la alcohol isopropílico deshidrogenasa incluyen los derivados de bacterias del género *Clostridium* tal como *Clostridium beijerinckii*.

20 Como gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa a introducir en la bacteria hospedadora de la presente invención, se puede usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la alcohol isopropílico deshidrogenasa obtenido a partir de cualquiera de los organismos fuente anteriormente mencionados o una secuencia de ADN sintético sintetizada basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos adecuados de los mismos incluyen los derivados de bacterias del género *Clostridium*, tal como un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium beijerinckii*.

25 La CoA transferasa en la presente invención se clasifica con el número de código de enzimas: 2.8.3.8 basado en el Informe de la Comisión de Enzimas, Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B) y es un nombre genérico de enzimas que catalizan una reacción de producción de ácido acetoacético a partir de acetoacetil CoA.

30 Los ejemplos de la CoA transferasa incluyen los derivados de bacterias del género *Clostridium* tales como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, bacterias del género *Roseburia* tal como *Roseburia intestinalis*, bacterias del género *Faecalibacterium* tal como *Faecalibacterium prausnitzii*, bacterias del género *Coprococcus*, *Trypanosoma* tal como *Trypanosoma brucei*, y bacterias del género *Escherichia* tal como *Escherichia coli* (el bacilo del colon).

35 Como gen de CoA transferasa usado en la presente invención, se puede usar un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen que codifica la CoA transferasa obtenido a partir de cualquiera de los organismos fuente anteriormente mencionados o una secuencia de ADN sintético sintetizada basándose en una secuencia de bases conocida del gen. Los ejemplos adecuados de los mismos incluyen ADNs que tienen las secuencias de bases de genes derivados de bacterias del género *Clostridium* tal como *Clostridium acetobutylicum*, bacterias del género *Roseburia* tal como *Roseburia intestinalis*, bacterias del género *Faecalibacterium* tal como *Faecalibacterium prausnitzii*, bacterias del género *Coprococcus*, *Trypanosoma* tal como *Trypanosoma brucei* y bacterias del género *Escherichia* tal como *Escherichia coli*. Son más preferidos los derivados de bacterias del género *Clostridium* o bacterias del género *Escherichia*. Es particularmente preferible un ADN que tiene la secuencia de bases de un gen derivado de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli*.

40 Como se ha descrito anteriormente, la tiolasa usada para producir alcohol isopropílico en la presente invención se clasifica con el número de código de enzimas: 2.3.1.9 basado en el Informe de la Comisión de Enzimas, Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B) y es el nombre genérico de las enzimas que catalizan la reacción de producción de acetoacetil CoA a partir de acetil CoA. Con relación a los detalles de la tiolasa, se deben aplicar como son los detalles anteriormente descritos de la misma.

45 Entre las anteriores, es preferible que cada una de las cuatro enzimas derive de al menos una seleccionada del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*, desde el punto de vista de la actividad enzimática. En particular, son más preferibles un caso en el que una acetoacetato descarboxilasa y alcohol isopropílico deshidrogenasa derivan de una bacteria o bacterias del género *Clostridium* y la actividad de CoA transferasa y la actividad de tiolasa derivan de una bacteria o bacterias del género *Escherichia*, y un caso en el que todas de las cuatro enzimas derivan de una bacteria o bacterias del género *Clostridium*.

50 En particular, desde el punto de vista de la actividad enzimática, es preferible que cada una de las cuatro enzimas en la presente invención derive de *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* o *Escherichia coli*, es más preferible que la acetoacetato descarboxilasa sea una enzima derivada de *Clostridium acetobutylicum*, cada una de CoA transferasa y tiolasa sea una enzima derivada de *Clostridium acetobutylicum* o *Escherichia coli*, y la alcohol isopropílico deshidrogenasa sea una enzima derivada de *Clostridium beijerinckii*. Desde el punto de vista de la actividad enzimática, las cuatro enzimas son particularmente preferentemente tal que la actividad de acetoacetato descarboxilasa derive de *Clostridium acetobutylicum*, la actividad de alcohol isopropílico deshidrogenasa derive de *Clostridium beijerinckii* y la actividad de CoA transferasa y la actividad de tiolasa deriven de *Escherichia coli*.

65 En la presente invención, como un ejemplo de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico equipada con el sistema de producción de alcohol isopropílico que incluye una actividad de tiolasa, se pueden ejemplificar una cepa

pIPA/B o una cepa plaaa/B descritas en el documento de patente WO2009/008377. Además, la *Escherichia coli* incluye una cepa (que se puede denominar cepa pla/B::atoDAB), en la que, entre las enzimas implicadas en la producción de alcohol isopropílico, se potencian la actividad de CoA transferasa y la actividad de tiolasa potenciando la expresión de cada uno de estos genes en el genoma de *Escherichia coli* y se potencian la actividad de alcohol isopropílico deshidrogenasa y la actividad de acetoacético ácido descarboxilasa potenciando la expresión de cada uno de estos genes usando un plásmido.

En la presente invención, es preferible que se incluya una actividad de malato deshidrogenasa potenciada como actividad enzimática potenciada desde el punto de vista de mejorar más eficazmente la productividad de alcohol isopropílico. Es más preferible que estén incluidas una actividad de malato deshidrogenasa potenciada y una actividad de tiolasa potenciada o estén incluidas una actividad de malato deshidrogenasa potenciada y una actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) potenciada, y es lo más preferible que se incluyan todas de una actividad de malato deshidrogenasa potenciada, una actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) potenciada y una actividad de tiolasa potenciada.

En la presente invención, es lo más preferible potenciar la expresión de genes respectivos que codifican la malato deshidrogenasa, la NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) y la tiolasa. Esto permite un espectacular aumento en la productividad y rendimiento de alcohol isopropílico en comparación con un caso de potenciamiento de la actividad de cada enzima individualmente.

Una realización preferible de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en la presente invención es una cepa obtenida potenciando la actividad de malato deshidrogenasa, o potenciando simultáneamente la actividad de malato deshidrogenasa y la actividad de the NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) y/o la tiolasa, en la cepa pIPA/B, la cepa plaaa/B o la cepa pla/B::atoDAB descritas anteriormente. La actividad de tiolasa en esta cepa puede ser una actividad alcanzada potenciando la expresión de un gen que codifica tiolasa en el genoma, así como potenciando la expresión de un gen que codifica tiolasa usando un plásmido.

Una realización más preferible de la misma es una cepa obtenida potenciando la actividad de malato deshidrogenasa, o potenciando simultáneamente la actividad de malato deshidrogenasa y la actividad de la NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) y/o la tiolasa, en la cepa pIPA/B, la cepa plaaa/B, o la cepa pla/B::atoDAB descritas anteriormente. En esta cepa, la actividad de tiolasa puede ser una actividad lograda potenciando la expresión de un gen que codifica tiolasa en el genoma, así como potenciando la expresión de un gen que codifica tiolasa usando un plásmido.

Una realización particularmente preferible de las mismas es una cepa obtenida potenciando simultáneamente la actividad de malato deshidrogenasa, la actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) y la actividad de tiolasa en la cepa pIPA/B, la cepa plaaa/B, o la cepa pla/B::atoDAB descrita anteriormente. En esta cepa, la actividad de tiolasa puede ser una actividad lograda potenciando la expresión de un gen que codifica tiolasa en el genoma, así como potenciando la expresión de un gen que codifica tiolasa usando un plásmido.

Una realización más preferible de la misma es una cepa obtenida potenciando simultáneamente la actividad de malato deshidrogenasa, la actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) y la actividad de tiolasa en la cepa anteriormente descrita o en la cepa pla/B::atoDAB. En esta cepa, la actividad de tiolasa puede ser una actividad lograda potenciando la expresión de un gen que codifica tiolasa en el genoma, así como potenciando la expresión de un gen que codifica tiolasa usando un plásmido.

El promotor para un gen en la presente invención puede ser cualquier promotor capaz de controlar la expresión de cualquiera de los genes descritos anteriormente. El promotor de gen puede ser un promotor poderoso que funciona constitutivamente en un microorganismo y cuya expresión es difícilmente suprimida incluso en presencia de glucosa. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen un promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (que se puede denominar en lo sucesivo GAPDH) y un promotor de serina hidroximetiltransferasa.

El promotor en la presente invención se refiere a una región a la que se une una ARN polimerasa que tiene un factor sigma para iniciar la transcripción. Por ejemplo, se muestra un promotor de GAPDH derivado de *Escherichia coli* en los números de base 397-440 en la información de secuencias de bases de Número de acceso de GenBank X02662.

Los genes de CoA transferasa (atoD y atoA) y un gen de tiolasa (atoB) derivados de *Escherichia coli* forman un operón en el orden de atoD, atoA y atoB en el genoma de *Escherichia coli* (Journal of Bacteriology Vol. 169 pp 42-52 Lauren Sallus Jenkins *et al*). Así, se puede controlar simultáneamente la expresión del gen de CoA transferasa y el gen de tiolasa modificando el promotor para atoD.

Por consiguiente, cuando la actividad de CoA transferasa y la actividad de tiolasa son las derivadas de los genes genómicos de *Escherichia coli* hospedadora, la expresión de ambos genes de enzima se potencia preferentemente, por ejemplo, por sustitución de otro promotor por un promotor responsable de la expresión de ambos genes de enzima, desde el punto de vista de adquirir suficiente capacidad de producción de alcohol isopropílico. Los ejemplos

de un promotor usado para potenciar la expresión de la actividad de CoA transferasa y la actividad de tiolasa incluyen el promotor de GAPDH derivado de *Escherichia coli* anteriormente mencionado.

5 Las actividades de estas enzimas en la presente invención pueden ser actividades introducidas desde fuera de la célula bacteriana en la célula bacteriana, o actividades logradas potenciando la expresión de los genes de enzima por potenciamiento de la actividad de promotor para los genes de enzima que posee la bacteria hospedadora en su genoma o por sustitución de la actividad de promotor con otro promotor.

10 La introducción de actividad enzimática se puede realizar, por ejemplo, por introducción de un gen que codifica enzima desde fuera de la célula bacteriana de la bacteria hospedadora en la célula bacteriana usando una técnica de recombinación genética. En este caso, el gen de enzima a introducir puede ser o bien homólogo o heterólogo para la célula hospedadora. La preparación de un ADN genómico necesario para la introducción de un gen desde fuera de la célula bacteriana en la célula bacteriana, la escisión y ligación de ADN, transformación, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), el diseño y la síntesis de oligonucleótidos usados como cebadores, etc., se pueden llevar a cabo por métodos bien conocidos para los expertos en la técnica. Dichos métodos se describen en, por ejemplo, Sambrook, J., et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Segunda Edición", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).

20 En la presente invención, *Escherichia coli* que tiene una actividad enzimática potenciada se refiere a una *Escherichia coli* en la que la actividad enzimática se potencia por un cierto método. Dicha *Escherichia coli* se puede producir por métodos tales como la introducción de un gen que codifica la enzima y proteína desde fuera de la célula bacteriana en la célula bacteriana usando un plásmido según la misma técnica de recombinación genética que se ha descrito anteriormente, o la expresión potenciada de un gen de enzima por potenciamiento de la actividad de promotor para el gen de enzima en el genoma de la *Escherichia coli* hospedadora o por sustitución de la actividad de promotor con otro promotor.

25 En la presente invención, el término "*Escherichia coli*" significa una *Escherichia coli* que se puede preparar para poseer la capacidad de producir alcohol isopropílico a partir de un material de partida derivado de planta usando un cierto medio, independientemente de si la *E. coli* tiene o no inherentemente la capacidad innata de producir alcohol isopropílico a partir de un material de partida derivado de planta.

30 En el presente documento, la *Escherichia coli* que se va a someter a la recombinación genética anteriormente mencionada puede ser una *Escherichia coli* que no tiene la capacidad de producción de alcohol isopropílico, y puede ser cualquier *Escherichia coli* capaz de introducción y modificación de cada uno de los genes anteriormente descritos.

35 La *Escherichia coli* puede ser más preferentemente una *Escherichia coli* con la capacidad de producción de alcohol isopropílico que se ha conferido por adelantado, que puede alcanzar la producción más eficiente de alcohol isopropílico.

40 Los ejemplos de dicha *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico incluyen una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico a la que se han conferido una actividad de acetoacetato descarboxilasa, una actividad de alcohol isopropílico deshidrogenasa, una actividad de CoA transferasa y una actividad de tiolasa, y que puede producir alcohol isopropílico a partir de un material en bruto derivado de planta.

45 El método de producción de alcohol isopropílico de la presente invención incluye producir alcohol isopropílico a partir de un material de partida derivado de planta usando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico anteriormente descrita. Específicamente, el método de producción de alcohol isopropílico de la invención incluye un proceso de poner en contacto la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico con un material de partida derivado de planta y cultivar la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, y un proceso de recuperación de recuperar el alcohol isopropílico obtenido por el contacto.

50 El material de partida derivado de planta usado en el método de producción de alcohol isopropílico es una fuente de carbono obtenido a partir de una planta y no está específicamente limitado en tanto que sea un material de partida derivado de planta. El material de partida derivado de planta en la presente invención se refiere a un órgano tal como raíz, tallo, tronco, rama, hoja, flor, o semilla, un cuerpo de planta de los incluye, o un producto de descomposición de cualquier órgano de planta. Además, el alcance del material de partida derivado de planta también engloba fuentes de carbono que se pueden utilizar como fuentes de carbono por microorganismos durante el cultivo de las fuentes de carbono obtenidas a partir del cuerpo de planta, los órganos de planta, o los productos de descomposición de los mismos.

55 Los ejemplos generales de fuentes de carbono que engloba el alcance del material de partida derivado de planta incluyen sacáridos tales como almidón, sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa y arabinosa, madera y productos de descomposición herbáceos e hidrolizados de celulosa que contienen estos componentes en alta proporción, y combinaciones de los mismos. Además, el alcance de la fuente de carbono en la presente invención también engloba glicerina derivada de aceite vegetal o ácido graso.

60

Los ejemplos preferibles del material de partida derivado de planta en la presente invención incluyen productos agrícolas tales como cultivos, maíz, arroz, trigo, soja, caña de azúcar, remolacha, algodón, y combinaciones de los mismos. La forma de uso como material de partida no está particularmente limitada, y puede ser un producto sin procesar, zumo, un producto machacado, o similares. También es posible usar solo la fuente de carbono anteriormente descrita como material de partida.

En el proceso de cultivo, la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico y el material de partida derivado de planta se ponen en contacto entre sí generalmente cultivando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en un medio de cultivo que incluye el material de partida derivado de planta.

La densidad de contacto entre el material de partida derivado de planta y la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico varía dependiendo de la actividad de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico. En general, la concentración del material de partida derivado de planta en el medio de cultivo se puede establecer de forma que la concentración de azúcar inicial en términos de glucosa se puede establecer hasta 20 % en masa o menos con respecto a la masa total de la mezcla, y, desde el punto de vista de la resistencia al azúcar de la *Escherichia coli*, la concentración de azúcar inicial se establece preferentemente hasta 15 % en masa o menos. Se pueden añadir otros componentes en cantidades normalmente añadidas a los medios de cultivo de microorganismo, sin limitación particular.

El contenido de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en el medio de cultivo varía dependiendo del tipo y la actividad de la *Escherichia coli*. En general, la concentración bacteriana inicial se puede establecer para ser desde 0,1 hasta 30 % en masa con respecto al medio de cultivo, y, desde el punto de vista de controlar las condiciones de cultivo, la concentración bacteriana inicial se establece preferentemente para ser desde 1 hasta 10 % en masa con respecto al medio de cultivo.

El medio de cultivo que se va a usar para el cultivo de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico puede ser cualquier medio de cultivo comúnmente usado que incluye una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y un ion inorgánico, así como elementos orgánicos secundarios, ácido nucleico, vitaminas, etc., requeridos por el microorganismo para la producción de ácido láctico, sin limitación particular.

Las condiciones de cultivo para el cultivo en la invención no están específicamente limitadas, y el cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, en condiciones aerobias con control apropiado de pH y temperatura dentro de un intervalo de pH 4 a 9, preferentemente pH 6 a 8, y una temperatura de 20 a 50 °C, preferentemente 25 a 42 °C.

La cantidad de gas de aireación no está particularmente limitada. En un caso en el que solo se usa aire como gas, la cantidad de aireación es generalmente desde 0,02 hasta 2,0 vvm (vvm; volumen de aireación [ml]/volumen de líquido [ml]/tiempo [min]), y preferentemente desde 0,1 hasta 2,0 vvm desde el punto de vista de suprimir el daño físico a *Escherichia coli*.

El proceso de cultivo se puede continuar desde el inicio del cultivo hasta que se agote el material de partida derivado de planta en la mezcla o hasta que desaparezca la actividad de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico. La duración del proceso de cultivo varía dependiendo del número y la actividad de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico y la cantidad del material de partida derivado de planta, pero la duración puede ser generalmente 1 hora o más, y preferentemente 4 horas o más. Aunque el periodo de cultivo se puede continuar ilimitadamente mediante alimentación adicional del material de partida derivado de planta o la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, el periodo de cultivo se puede establecer generalmente hasta 5 días o menos, y preferentemente 72 horas o menos, desde el punto de vista de la eficiencia de procesamiento. Con respecto a otras condiciones, se pueden aplicar directamente condiciones usadas para el cultivo usual.

El método de recuperación del alcohol isopropílico acumulado en el medio de cultivo no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede emplear un método en el que las células bacterianas se retiran del medio de cultivo, por ejemplo, por centrifugación, y luego se separa el alcohol isopropílico por una técnica de separación usual tal como evaporación o separación de películas.

El método de producción de alcohol isopropílico de la presente invención puede incluir, antes del proceso de cultivo para la producción de alcohol isopropílico, un proceso de precultivo de obtención de un número apropiado o estado activo apropiado de células de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico para su uso. El proceso de precultivo puede ser cualquier cultivo en condiciones de cultivo normalmente empleadas adecuadas for el tipo de bacteria productora de alcohol isopropílico.

El método de producción de alcohol isopropílico de la presente invención incluye preferentemente un proceso de cultivo de cultivar la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico mientras que se suministra un gas dentro de una mezcla que contiene la bacteria productora de alcohol isopropílico y un material de partida derivado de planta, y un proceso de recuperación de separar y recuperar el alcohol isopropílico producido por el cultivo de la mezcla.

Según este método, la *Escherichia coli* para la producción se cultiva mientras que se suministra un gas dentro de la

mezcla (cultivo con aireación). Por el cultivo con aireación, el alcohol isopropílico producido se libera dentro la mezcla y se evapora de la mezcla, como resultado de lo cual el alcohol isopropílico producido puede ser fácilmente separado de la mezcla. Además, puesto que el alcohol isopropílico producido se separa continuamente de la mezcla, se puede suprimir el aumento en la concentración de alcohol isopropílico en la mezcla. Así, no existe
5 necesidad particular de considerar la resistencia de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico contra alcohol isopropílico.

La mezcla en el presente método puede contener un medio de cultivo básico usado generalmente para cultivar *Escherichia coli* como el principal componente. Con respecto a las condiciones de cultivo, se deben aplicar
10 directamente los detalles de las mismas descritos anteriormente.

En el proceso de recuperación, se recupera el alcohol isopropílico producido en el proceso de cultivo y separado de la mezcla. El método de recuperación puede ser cualquier método que pueda recoger alcohol isopropílico en forma gaseosa o de gotitas que se ha evaporado de la mezcla por el cultivo usual. Los ejemplos de dicho método incluyen
15 recuperar alcohol isopropílico en un miembro de recogida tal como un recipiente estanco al aire comúnmente usado. En particular, el método de recuperación incluye preferentemente poner en contacto un líquido de captura para la captura de alcohol isopropílico con el alcohol isopropílico separado de la mezcla, desde el punto de vista de permitir la recuperación de alta pureza de solo alcohol isopropílico.

En este método, se puede recuperar el alcohol isopropílico en el estado disuelto en el líquido de captura o la mezcla. Los ejemplos de dicho método de recuperación incluyen un método descrito en el folleto del documento de patente
20 WO 2009/008377. El alcohol isopropílico recuperado se puede identificar usando un medio de detección usual tal como HPLC. El alcohol isopropílico recuperado se puede purificar adicionalmente, según sea necesario. El método de purificación puede ser, por ejemplo, destilación o similares.

Cuando el alcohol isopropílico recuperado está en el estado de solución acuosa, el método de producción de alcohol isopropílico puede incluir además un proceso de deshidratación, además del proceso de recuperación. La
25 deshidratación de alcohol isopropílico se puede realizar por un método usual.

Un ejemplo de un aparato aplicable al método para producir alcohol isopropílico que se puede recuperar en forma disuelta del líquido de captura o la mezcla es un aparato de producción mostrado en la Fig. 1 del folleto del
30 documento de patente WO2009/008377.

En el aparato de producción, un tubo de inyección para inyectar un gas desde fuera del aparato se inyecta a un tanque de cultivo que aloja un medio de cultivo que incluye una bacteria productora de alcohol isopropílico y un
35 material de partida derivado de planta, permitiendo así la aireación en el medio de cultivo.

Además, el tanque de cultivo está conectado a, mediante un tubo de conexión, un tanque de trampa que aloja un líquido de trampa como líquido de captura. En este caso, un gas o un líquido que se ha movido al tanque de trampa
40 se pone en contacto con el líquido de trampa para provocar burbujeo.

Como resultado de esto, el alcohol isopropílico producido en el tanque de cultivo por cultivo con aireación se evapora por la aireación y se separa fácilmente del medio de cultivo, y se captura por el líquido de trampa en el
45 tanque de trampa. Como resultado, el alcohol isopropílico se puede producir continuamente y fácilmente en una forma más purificada.

Según el método de producción de alcohol isopropílico de la presente invención, se puede producir rápidamente alcohol isopropílico, y la velocidad de producción normalmente obtenida por el mismo método es superior a en un
50 caso en el que no se aplica la presente invención. La velocidad de producción varía dependiendo de las condiciones para el método de producción y el estado de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que se va a usar, pero se puede obtener una velocidad de producción de desde 0,7 hasta 2,0 g/l/h, preferentemente 0,9 hasta 1,9 g/l/h. Además, según el método de producción de alcohol isopropílico de la presente invención, el alcohol isopropílico se puede producir eficazmente a partir de glucosa, y el rendimiento normalmente obtenido por el mismo método es superior a en un caso en el que no se aplica la presente invención. El rendimiento varía dependiendo de
55 las condiciones para el método de producción y el estado de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que se va a usar, y se puede obtener un rendimiento de desde 51 hasta 80 %, preferentemente desde 51 hasta 66 %, al fin del proceso de cultivo.

En la presente invención, el término "rendimiento" representa una velocidad de conversión basada en una ecuación estequiométrica para la conversión de glucosa como sustrato en alcohol isopropílico como metabolito. En la
60 *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico, se produce 1 mol de alcohol isopropílico a partir de 1 mol de glucosa. Por consiguiente, considerando los pesos moleculares de glucosa y el alcohol isopropílico (glucosa = ISO; alcohol isopropílico = 60), aunque 180 g de glucosa se convierten todos en alcohol isopropílico, la cantidad de alcohol isopropílico producido será de solo 60 g, y nunca puede ser superior a esa. Esta velocidad de conversión
65 teóricamente máxima se define como el rendimiento del 100 % en la presente invención.

Como se ha descrito anteriormente, la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de la presente invención puede producir alcohol isopropílico rápidamente con alto rendimiento. Por tanto, por ejemplo, cuando se produce alcohol isopropílico usando la *Escherichia coli* de la presente invención como catalizador, se pueden acumular 97 g/l o más de alcohol isopropílico en 72 horas de cultivo, de manera que se puede lograr una productividad sorprendentemente mayor que en los catalizadores convencionales.

Ejemplos

En lo sucesivo, se describirán los ejemplos de la presente invención, pero la invención no se limita a estos. En la descripción, "%" se basa en masa, a menos que se especifique de otro modo.

[Ejemplo 1]

<[B::pntA]: Producción de la cepa potenciada en el genoma de B pnt de *Escherichia coli*>

Se sustituyó un promotor del gen pntA en el genoma de una cepa B de *Escherichia coli* con un promotor de GAPDH para potenciar la expresión del gen pntA.

Se conoce la secuencia de bases entera del ADN genómico de una cepa MG1655 de *Escherichia coli* (Número de acceso de GenBank U00096), y también se ha informado la secuencia de bases de un gen que codifica una subunidad α de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) de *Escherichia coli* (que se puede abreviar en lo sucesivo pntA) (Número de acceso de GenBank X04195), Además, se conoce que pntA y una subunidad β de transhidrogenasa de membrana (pntB) forman un operón en el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli*.

Como secuencia de bases de un promotor necesario para permitir la expresión del gen, se puede usar una secuencia de promotor de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (que se puede denominar en lo sucesivo GAPDH) derivada de la *Escherichia coli* descritas en 397 a 440 en la información de secuencias de bases de Número de acceso de GenBank X02662. Para obtener el promotor de GAPDH, se llevó a cabo amplificación por el método de PCR usando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como molde, y usando cgctcaattgcaatgattgacacgattccg (SEQ ID NO: 1) y acagaattcgctattgttagtgaataaaagg (SEQ ID NO: 2). Se digirió el fragmento de ADN obtenido con las enzimas de restricción MfeI y EcoRI para obtener un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 100 pb que codificaba el promotor de GAPDH. Se mezclaron juntos el fragmento de ADN obtenido y un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pUC19 (Número de acceso de GenBank X02514) con la enzima de restricción EcoRI y procesamiento adicional con fosfatasa alcalina, y se ligaron usando una ligasa. Se transformaron células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (DNA-903 fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligación resultante, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció sobre una placa de agar de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Diez de las colonias obtenidas se cultivaron cada una durante la noche a 37 °C en un medio líquido de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, y se recuperaron plásmidos. Se seleccionó un plásmido del que no se cortó el promotor de GAPDH cuando se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI, y se confirmó la secuencia de ADN del mismo. El plásmido en el que el promotor de GAPDH se insertó apropiadamente se denominó pUCgapP. El pUCgapP obtenido se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII.

Además, para obtener un pntA, se llevó a cabo amplificación por PCR usando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como molde, y usando gcagcaattgctggtggaacatatgcgaattggcataccaag (SEQ ID NO: 3) y ggacaagcttaattttgcggaacatttcagc (SEQ ID NO: 4). Se digirió el fragmento de ADN obtenido con las enzimas de restricción MfeI y HindIII para obtener un fragmento de pntA con un tamaño de aproximadamente 1,6 kpb. Este fragmento de ADN se mezcló con pUCgapP que se había digerido previamente con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, y se ligó usando una ligasa. Se transformaron células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (DNA-903 fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció sobre una placa de agar de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó la inserción correcta de pntA. Este plásmido se denominó pGAPpntA.

Aquí, la cepa MG1655 de *Escherichia coli* está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha esclarecido el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli*, y también se ha informado la secuencia de bases cerca de pntA. Usando atggtaccgcagtaatacgtggtg (SEQ ID NO: 5) y cctctagacttccatcggtttattgatgatg (SEQ ID NO: 6) preparados basándose en la información de genes de la región 5' cercana de pntA de la cepa MG1655 de *Escherichia coli*, se llevó a cabo PCR con el molde de ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* para amplificar un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 1,0 kpb. Este fragmento de ADN se trató con las enzimas de restricción KpnI y XbaI.

Además, usando un cebador de ggtctagagcaatgattgacacgattccg (SEQ ID NO: 7) preparado basándose en la información de secuencias del promotor de GAPDH de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* y el cebador de SEQ ID NO: 4 preparado basándose en la información de secuencias de pntA de la cepa MG1655 de *Escherichia*

coli, se llevó a cabo PCR usando, como molde, el vector de expresión pGAPpntA previamente preparado, como resultado del cual se obtuvo un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 1,7 kpb que incluía el promotor de GAPDH y pntA. El fragmento de ADN se trató con las enzimas de restricción XbaI y HindIII.

5 Se mezclaron el fragmento de ADN de la región 5' cercana de pntA y el fragmento de ADN que incluye el promotor de GAPDH y pntA así obtenidos con un fragmento de ADN obtenido digiriendo un plásmido sensible a la temperatura pTH18csl (Número de acceso de GenBank AB019610) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)] con KpnI y HindIII, y luego se ligó usando una ligasa. Se transformó la cepa DH5α con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció a 30 °C sobre una placa de agar de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol. Se cultivaron las colonias obtenidas durante la noche a 30 °C en un medio líquido de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol. Entonces, se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó la inserción apropiada de la región 5' cercana de pntA, el promotor de GAPDH y pntA. Se transformó la cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) con este plásmido, y se cultivó durante la noche a 30 °C sobre una placa de agar de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol para obtener un transformante. Se inoculó el transformante obtenido en un medio líquido de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se cultivó durante la noche a 30 °C. Se aplicaron las células bacterianas cultivadas obtenidas sobre una placa de agar de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se cultivó a 42 °C para obtener colonias. Se cultivaron las colonias obtenidas en un medio líquido de LB que no contenía antibiótico a 30 °C durante 4 horas, y se aplicaron sobre una placa de agar de LB que no contenía antibiótico, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias capaces de crecer a 42 °C.

20 A partir de las colonias que aparecieron, se cogieron al azar 100 colonias. Se dejó que cada una de ellas creciera sobre una placa de agar de LB que no contenía antibiótico y sobre una placa de agar de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles a cloranfenicol. Además, del ADN genómico de estos clones, se amplificó por PCR un fragmento con un tamaño de aproximadamente 1,7 kpb que incluía el promotor de GAPDH y pntA, y entonces se seleccionó una cepa en la que la región promotora de pntA se sustituyó con el promotor de GAPDH. Un clon que cumplía todo lo anterior se denominó cepa insertada en el genoma de GAPpntA delecionado en B pntA de *Escherichia coli* (que se puede abreviar en lo sucesivo cepa B::pnt).

30 Aquí, la cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, que es un banco de células, microorganismos y genes.

[Ejemplo 2]

35 <pGAP-laaa/B::pnt>: Preparación de cepa potenciada en el genoma de B pnt de *Escherichia coli* a la que se introduce el vector de expresión para gen de tiolasa derivado de *Escherichia coli*, gen de CoA transferasa derivado de *Escherichia coli*, gen de acetoacetato descarboxilasa derivado de bacteria del género *Clostridium*, y gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa derivado de bacteria del género *Clostridium*>

40 Se preparó del siguiente modo una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que tenía expresión potenciada del gen de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) (pnt).

45 Se transformó la cepa B::pnt producida en el Ejemplo 1 con pGAP-laaa descrita en el Ejemplo 4 del documento de patente WO2009/008377, para obtener una cepa pGAP-laaa/B::pnt. pGAP-laaa es un plásmido de vector de expresión capaz de potenciar la expresión de un gen de tiolasa derivado de *Escherichia coli*, un gen de CoA transferasa derivado de *Escherichia coli*, un gen de acetoacetato descarboxilasa derivado de *Clostridium acetobutylicum* y un gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa derivado de *Clostridium beijerinckii* usando el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) derivado de *Escherichia coli*. El método de preparación de pGAP-laaa se describe en el Ejemplo 4 del documento de patente WO2009/008377.

50 [Ejemplo 3]

<[B::atoDAB]: Preparación de la cepa potenciada en el genoma de B atoDAB de *Escherichia coli*>

55 Los genes de CoA (atoD y atoA) y el gen de tiolasa (atoB) derivados de *Escherichia coli* forman un operón en el genoma de *Escherichia coli* en el orden de atoD, atoA y atoB (Journal of Bacteriology Vol. 169 pp 42-52 Lauren Sallus Jenkins *et al*). Por consiguiente, modificando el promotor de atoD, se puede controlar simultáneamente la expresión del gen de CoA transferasa y del gen de tiolasa. Así, se sustituyó el promotor del gen atoD en el genoma de *Escherichia coli* hospedadora con el promotor de GAPDH para preparar una *Escherichia coli* que tenía expresión potenciada del gen atoD, gen atoA y gen atoB.

60 Se conoce la secuencia de bases completa del ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* (Número de acceso de GenBank U00096), y también se ha informado la secuencia de bases de un gen (que se puede abreviar en lo sucesivo atoD) que codifica una subunidad α de CoA transferasa de la cepa MG1655 de *Escherichia coli*. Específicamente, atoD se describe en 2321469 a 2322131 de la secuencia del genoma de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* mostrada en el Número de acceso de GenBank U00096.

65

Como secuencia de bases de un promotor necesario para permitir la expresión del gen anterior, se puede usar una secuencia de promotor de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) derivada de *Escherichia coli* descrita en 397 a 440 en la información de secuencias de bases de Número de acceso de GenBank X02662. Para obtener el promotor de GAPDH, se llevó a cabo la amplificación por PCR usando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como molde y usando cgctcaattgcaatgattgacacgattccg (SEQ ID NO: 1) y acagaattcgctattgttagtgaataaaagg (SEQ ID NO: 2). Se digirió el fragmento de ADN obtenido con las enzimas de restricción MfeI y EcoRI para obtener un fragmento de ADN con el tamaño de aproximadamente 100 pb que codificaba el promotor de GAPDH. Se digirió el fragmento de ADN obtenido con las enzimas de restricción MfeI y EcoRI para obtener un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 100 pb que codificaba el promotor de GAPDH. Se mezclaron juntos el fragmento de ADN obtenido y un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pUC19 (Número de acceso de GenBank X02514) con la enzima de restricción EcoRI y tratando adicionalmente con fosfatasa alcalina, y se ligaron usando una ligasa. Se transformaron células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (DNA-903 fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció sobre una placa de agar de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Se cultivaron diez de las colonias obtenidas cada una durante la noche a 37 °C en un medio líquido de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina, y se recuperaron los plásmidos. Se seleccionó un plásmido del promotor de GAPDH que no se cortó cuando se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI. Se confirmó la secuencia de ADN de la misma, y un plásmido en el que el promotor de GAPDH se insertó apropiadamente se denominó pUCgapP. pUCgapP obtenido se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI.

Además, para obtener atoD, usando el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* como molde, se realizó amplificación por PCR con cgaattcgctggggaacatatgaaaacaaatgatgacattacaagac (SEQ ID NO: 8) y gcggctacctattgtctctcctgtgaaacg (SEQ ID NO: 9). Se digirió el fragmento de ADN obtenido con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI para obtener un fragmento de atoD con un tamaño de aproximadamente 690 pb. Se mezcló el fragmento de ADN con pUCgapP que se había digerido previamente con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI para ser ligadas usando una ligasa, y se transformaron células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (DNA-903 fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) para obtener un transformante que creció sobre una placa de agar de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas y se hizo la confirmación en cuanto a si atoD se insertó apropiadamente. El plásmido se denominó pGAPatoD.

Aquí, la cepa MG1655 de *Escherichia coli* está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

Como se ha mencionado anteriormente, también se ha informado la secuencia de bases de atoD en el ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli*. Usando gctctagatgctgaaatccactagctctgtc (SEQ ID NO: 10) y tactgcagcgttccagcaccctatcaacc (SEQ ID NO: 11) preparados basándose en la información de genes de la región 5' cercana de atoD en la cepa MG1655 de *Escherichia coli*, se llevó a cabo PCR con el molde de ADN genómico de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* para amplificar un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 1,1 kpb.

Además, usando un cebador de ggtctagagcaatgattgacacgattccg (SEQ ID NO: 12) preparado basándose en la información de secuencias del promotor de GAPDH de la cepa MG1655 de *Escherichia coli* y el cebador de SEQ ID NO: 9 preparado basándose en la información de secuencias de atoD de la cepa MG1655 de *Escherichia coli*, se llevó a cabo PCR usando, como molde, el vector de expresión previamente preparado pGAPatoD, para obtener un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 790 pb que incluía el promotor de GAPDH y atoD.

Los fragmentos así obtenidos se digirieron con las enzimas de restricción PstI y XbaI, y con las enzimas de restricción XbaI y KpnI, respectivamente, y se mezclaron con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido sensible a la temperatura pTH18cs1 (Número de acceso de GenBank AB019610) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)] con PstI y KpnI, y se ligó usando una ligasa. Se transformó la cepa DH5 α con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció a 30 °C sobre una placa de agar de LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol. Se cultivaron las colonias obtenidas durante la noche a 30 °C en un medio líquido de LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y entonces, se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas. Se transformó la cepa B de *Escherichia coli* con este plásmido, y se cultivó durante la noche a 30 °C sobre una placa de agar de LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol para obtener un transformante. El transformante obtenido se inoculó en un medio líquido de LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se cultivó durante la noche a 30 °C. Se aplicaron las células bacterianas cultivadas obtenidas sobre una placa de agar de LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y se cultivaron a 42 °C para obtener colonias. Las colonias obtenidas se cultivaron en un medio líquido de LB que no contenía antibiótico a 30 °C durante 2 horas y se aplicaron sobre una placa de agar de LB que no contenía antibiótico, como resultado de lo cual se obtuvieron colonias capaces de crecer a 42 °C.

A partir de las colonias que aparecieron, se cogieron al azar 100 colonias. Se dejó que cada una de ellas creciera sobre una placa de agar de LB que no contenía antibiótico y sobre una placa de agar de LB que contenía 10 μ g/ml de cloranfenicol, y entonces se seleccionaron clones sensibles a cloranfenicol. Además, a partir de ADN de cromosoma de estos clones, se amplificó por PCR un fragmento con un tamaño de aproximadamente 790 pb que incluía el promotor de GAPDH y atoD, y se seleccionó una cepa en la que la región promotora de atoD se substituyó

con el promotor de GAPDH. Un clon que cumplía todo lo anterior se denominó cepa insertada en el genoma de GAPpatoD delecionado en B atoD de *Escherichia coli* (que se puede abreviar en lo sucesivo cepa B::atoDAB).

[Ejemplo 4]

5 <Construcción de vector de expresión para el gen de acetoacetato descarboxilasa derivado de bacteria del género *Clostridium* y el gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa derivado de bacteria del género *Clostridium*>

10 Para obtener un gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa (IPAdh), se llevó a cabo la amplificación por PCR usando el ADN genómico de NRRL B-593 de *Clostridium beijerinckii* como molde y usando aatgcatgctggtggaacatatgaaaggtttgcaatgctagg (SEQ ID NO: 13) y gcgatccctcgagtataataactgctttaattaagtc (SEQ ID NO: 14). Se digirió el fragmento de ADN obtenido con las enzimas de restricción SphI y BamHI para obtener un fragmento de alcohol isopropílico deshidrogenasa con un tamaño de aproximadamente 1,1 kpb. Se mezcló el fragmento de ADN obtenido con un fragmento obtenido digiriendo pBRgapP (descrito en el Ejemplo 4 del documento de patente WO2009/008377) con las enzimas de restricción SphI y BamHI. Se ligó la mezcla usando una ligasa, y se transformaron células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (DNA-903 fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció sobre una placa de agar de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron durante la noche a 37 °C en un medio líquido de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó la inserción apropiada de IPAdh. Este plásmido se denominó pGAP-IPAdh.

20 Para obtener un gen de acetoacetato descarboxilasa (adc), se llevó a cabo la amplificación por PCR usando el ADN genómico de ATCC824 de *Clostridium acetobutylicum* como molde y usando cactcgaggctggtggaacatatgtaaaggatgaagtaattaacaattagc (SEQ ID NO: 15) y ggaattcggtaccgtcactctagaggatcctactaagataatcatatataactcagc (SEQ ID NO: 16). Se digirió el fragmento de ADN obtenido con las enzimas de restricción XhoI y EcoRI para obtener un fragmento de acetoacetato descarboxilasa con un tamaño de aproximadamente 700 pb. Se mezcló el fragmento de ADN obtenido con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido previamente preparado pGAP-IPAdh con las enzimas de restricción XhoI y EcoRI. Se ligó la mezcla usando una ligasa, y se transformaron células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (DNA-903 fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció sobre una placa de agar de LB que contenía 50 μ g/ml. de ampicilina. Las colonias obtenidas se cultivaron durante la noche a 37 °C en un medio líquido de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó la inserción apropiada de adc. Este plásmido se denominó pGAP-la.

35 Aquí, NRRL B-593 de *Clostridium beijerinckii* está disponible de la Colección de Cultivos de VTT, que es un banco de células y microorganismos.

[Ejemplo 5]

40 <[pGAP-la-gapP-atoB]: Construcción de vector de expresión para el gen de acetoacetato descarboxilasa derivado de bacteria del género *Clostridium*, el gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa derivado de bacteria del género *Clostridium* y el gen de tiolasa derivado de *Escherichia coli*>

45 Se conoce la secuencia de bases completa del ADN genómico de la cepa B de *Escherichia coli* (Número de acceso de GenBank CP000819), y también se ha informado la secuencia de bases de un gen que codifica tiolasa (acetil-CoA C-acetiltransferasa) de *Escherichia coli* (atoB) (Número de acceso de GenBank U08465). Para realizar la clonación de atoB (1.185 pb), se sintetizaron dos cebadores de oligonucleótidos mostrados como cgggatccttaattcaaccgttcaatcac (SEQ ID NO: 17) y ttccatgaaaaaattgtgtcgcgc (SEQ ID NO: 18). El cebador de SEQ ID NO: 17 tiene un sitio de reconocimiento de NdeI en el lado del extremo 5' del mismo y el cebador de SEQ ID NO: 18 tiene un sitio de reconocimiento de BamHI en el lado del extremo 5' del mismo, respectivamente.

50 Se preparó ADN genómico de la cepa B de *Escherichia coli* (ATCC11303) usando un kit de tejido DNeasy fabricado por QIAGEN Co. Ltd. Usando el ADN genómico obtenido como molde, se amplificó por PCR un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 1,2 pb (que se puede denominar en lo sucesivo fragmento atoB) con un par de cebadores de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18. Se separó el fragmento atoB y se recuperó por electroforesis en gel de agarosa, y se digirió con NdeI y BamHI. Se mezcló el fragmento de digestión con un producto digerido con NdeI-BamHI de pBRgapP, y se hizo reaccionar la mezcla con T4ADN ligasa. Se transformaron células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció a 37 °C sobre una placa de agar de LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. Se cultivaron las colonias obtenidas durante la noche a 37 °C en un medio líquido de LB que contenía 50 ng/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó la inserción apropiada de atoB. Este plásmido se denominó pGAP-atoB. Se digirió el plásmido pGAP-atoB obtenido con BglII y BamHI, y se separó y recuperó un fragmento que incluía el promotor de GAPDH y atoB por electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento se denominó gapP-atoB. Se mezcló el fragmento gapP-atoB con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pGAP-la preparado en el Ejemplo 4 con la enzima de restricción BamHI. Se ligó la mezcla usando una ligasa, y se transformaron las células competentes DH5 α de *Escherichia coli* (DNA-903 fabricadas por Toyobo Co.,

Ltd.) con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció sobre una placa de agar de LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se cultivaron las colonias obtenidas durante la noche a 37 °C en un medio líquido de LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó la inserción apropiada de gapP-atoB. Este plásmido se denominó pGAP-la-gapP-atoB.

5

[Ejemplo 6]

<[Cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB]: Preparación de la cepa potenciada en el genoma de B atoDAB de *Escherichia coli* por introducción de pGAP-la-gapP-atoB>

10

Se transformó la cepa B::atoDAB preparada en el Ejemplo 3 con pGAP-la-gapP-atoB descrita en el Ejemplo 5 anterior, para obtener una cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en la que la expresión del gen de tiolasa (atoB) se potencia en el genoma, así como se potencia usando el plásmido.

15

[Ejemplo 7]

<[pGAP-la-maeB]: Construcción del vector de expresión para el gen de acetoacetato descarboxilasa derivado de bacteria del género *Clostridium*, el gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa derivado de bacteria del género *Clostridium* y el gen de malato deshidrogenasa derivado de *Escherichia coli*>

20

Para obtener un gen de malato deshidrogenasa, se llevó a cabo la amplificación por PCR usando el genoma ADN de la cepa B de *Escherichia coli* como molde y usando cgggatcccggagaaagtcatatggatgaccagttaaaacaag (SEQ ID NO: 19) y gctctagattacagcgggtgggttgcgc (SEQ ID NO: 20). Se digirió el fragmento de ADN obtenido con las enzimas de restricción BamHI y XbaI para obtener un fragmento de malato deshidrogenasa con un tamaño de aproximadamente 2300 pb. Se mezcló el fragmento de ADN obtenido con un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pGAP-la preparado en el Ejemplo 4 con las enzimas de restricción XbaI y BamHI, y la mezcla se ligó usando una ligasa, se transformaron las células competentes DH5α de *Escherichia coli* (DNA-903 fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció sobre una placa de agar de LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se cultivaron las colonias obtenidas durante la noche a 37 °C en un medio líquido de LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó la inserción apropiada del gen de malato deshidrogenasa. Este plásmido se denominó pGAP-la-maeB.

25

30

35

[Ejemplo 8]

<[Cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB]: Preparación de la cepa potenciada en el genoma de B atoDAB de *Escherichia coli* por introducción de pGAP-la-maeB>

40

Se transformó la cepa B::atoDAB preparada en el Ejemplo 3 con pGAP-la-maeB descrita en el Ejemplo 7 anterior, para obtener una cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que tiene expresión potenciada del gen de malato deshidrogenasa (maeB).

45

[Ejemplo 9]

<Construcción de vector de expresión para el gen de acetoacetato descarboxilasa derivado de bacteria del género *Clostridium*, el gen de alcohol isopropílico deshidrogenasa derivado de bacteria del género *Clostridium*, el gen de malato deshidrogenasa derivado de *Escherichia coli* y el gen de tiolasa derivado de *Escherichia coli*>

50

Se mezclaron juntos un fragmento obtenido digiriendo el plásmido pGAP-la-maeB producido en el Ejemplo 7 anterior con la enzima de restricción BamHI y el fragmento de ADN gapP-atoB obtenido del mismo modo que en el Ejemplo 5, y se ligaron usando una ligasa. Entonces, se transformaron células competentes DH5α de *Escherichia coli* (DNA-903 fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con el producto de ligación, como resultado de lo cual se obtuvo un transformante que creció sobre una placa de agar de LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se cultivaron las colonias obtenidas durante la noche a 37 °C en un medio líquido de LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se recuperó un plásmido de las células bacterianas obtenidas, y se confirmó la inserción apropiada de gapP-atoB. Este plásmido se denominó pGAP-la-maeB-gapP-atoB.

55

60

[Ejemplo 10]

<[Cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB]: Preparación de cepa potenciada en el genoma de B atoDAB de *Escherichia coli* por introducción de pGAP-la-maeB-gapP-atoB>

65

Se transformó la cepa B::atoDAB preparada en el Ejemplo 3 con pGAP-la-maeB-gapP-atoB descrita en el Ejemplo 9 anterior, para obtener una cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que tiene expresión potenciada de tanto el gen de malato deshidrogenasa (maeB) como el gen de

tiolasa (atoB).

[Ejemplo 11]

5 <[B::atoDAB::pnt] Preparación de B atoDAB de *Escherichia coli* y la cepa potenciada en el genoma de pnt>

Se transformó la cepa B::atoDAB preparada en el Ejemplo 3 con un plásmido obtenido introduciendo el fragmento de ADN de la región 5' cercana de pntA y el fragmento de ADN que incluye el promotor de GAPDH y pntA en el plásmido pTH18cs1 sensible a la temperatura del mismo modo que en el Ejemplo 1, y se cultivó durante la noche a 30 °C sobre una placa de agar de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, para obtener un transformante. Se inoculó el transformante obtenido en un medio líquido de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se cultivó durante la noche a 30 °C. Se aplicaron las células bacterianas cultivadas obtenidas sobre una placa de agar de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se cultivó a 42 °C para obtener colonias. Se cultivaron las colonias obtenidas en un medio líquido de LB que no contenía antibiótico a 30 °C durante 2 horas, y se aplicaron sobre una placa de agar de LB que no contenía antibiótico, como resultado de lo cual se obtuvieron las colonias capaces de crecer a 42 °C.

A partir de las colonias que aparecieron, se cogieron al azar 100 colonias. Se dejó que cada una de ellas creciera sobre una placa de agar de LB que no contenía antibiótico y sobre una placa de agar de LB que contenía 10 µg/ml de cloranfenicol, y se seleccionaron clones sensibles a cloranfenicol. Además, a partir del ADN de cromosoma de los clones, se amplificó un fragmento con un tamaño de aproximadamente 1,7 kpb que incluía el promotor de GAPDH y se amplificó por PCR pntA, y se seleccionó una cepa en la que la región promotora de pntA se sustituyó con el promotor de GAPDH. Un clon que cumplía todo lo anterior se denominó la cepa insertada en el genoma de GAPpatoDGAPppntA delecionado en B atoD de *Escherichia coli* (que se puede abreviar en lo sucesivo cepa B::atoDAB::pnt).

[Ejemplo 12]

30 <[pGAP-la-maeB/B::atoDAB::pnt]: Preparación de la cepa insertada en el genoma de GAPpatoDGAPppntA delecionado en B atoD de *Escherichia coli* por introducción de pGAP-la-maeB>

Se transformó la cepa B::atoDAB::pnt preparada en el Ejemplo 11 con pGAP-la-maeB descrita en el Ejemplo 7, para obtener una cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB::pnt de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que tiene expresión potenciada de tanto el gen de malato deshidrogenasa (maeB) como el gen de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) (pnt).

[Ejemplo 13]

40 <[pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt]: Preparación de la cepa insertada en el genoma GAPpatoDGAPppntA delecionado en B atoD de *Escherichia coli* por introducción de pGAP-la-gapP-atoB>

Se transformó la cepa B::atoDAB::pnt preparada en el Ejemplo 11 con pGAP-la-gapP-atoB descrita en el Ejemplo 5, para obtener pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en la que la expresión del gen de tiolasa (atoB) se potenció en el genoma, así como se potenció por el plásmido, y en el que se potenció la expresión del gen de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) (pnt).

[Ejemplo 14]

50 <[Cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt]: Preparación de la cepa atoDAB y pntA potenciada en el genoma B de *Escherichia coli* por introducción de pGAP-la-maeB-gapP-atoB>

Se transformó la cepa B::atoDAB::pnt producida en el Ejemplo 11 con pGAP-la-maeB-gapP-atoB descrita en el Ejemplo 9 anterior, para obtener una cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico en la que se potenció la expresión del gen de malato deshidrogenasa (maeB) y el gen de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) (pnt), y en la que se potenció la expresión del gen de tiolasa (atoB) en el genoma, así como se potenció por el plásmido.

[Experimento 1 de evaluación]

60 <Producción de alcohol isopropílico por [Cepa pGAP-la-aaa/B], [Cepa pGAP-la-aaa/B::pntA], [Cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB], [Cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB], [Cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB], [pGAP-la-maeB/B::atoDAB::pnt], [pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt] y [Cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt]>

65 En el presente experimento de evaluación, se produjo alcohol isopropílico usando el aparato de producción mostrado en la Fig. 1 del folleto del documento de patente WO2009/008377. El tanque de cultivo usado tuvo una capacidad de 3 l, y el tanque de trampa usado tuvo una capacidad de 10 l. El tanque de cultivo, el tanque de trampa,

el tubo de inyección, el tubo de conexión y el tubo de descarga se hicieron todos de vidrio. Se inyectó agua como líquido de trampa (agua de trampa) en una cantidad de 9 l en el tanque de trampa. Además, el tanque de cultivo se proporcionó con un tubo de eliminación de solución residual para descargar una solución de cultivo, de la que la cantidad se aumentó debido a una adición de flujo de azúcar y un neutralizador, al exterior del tanque de cultivo según se necesitara.

Se inoculó cada una de la cepa pGAP-laaa/B descrita en el folleto del documento de patente W2009/008377, la cepa pGAP-laaa/B::pnt preparada en el Ejemplo 2 anterior, la cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB preparada en el Ejemplo 6 anterior, la cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB preparada en el Ejemplo 8, la cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB preparada en el Ejemplo 10, la cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB::pnt preparada en el Ejemplo 12, la cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt preparada en el Ejemplo 13 y la cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt preparada en el Ejemplo 14, para precultivar, en un matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad que contenía 100 ml de un caldo de LB, solución de cultivo de Miller (Difco 244620) que contenía 50 µm/ml de ampicilina, y se precultivó durante la noche a una temperatura de cultivo de 30 °C mientras se agitaba a una velocidad de 120 rpm.

Además, la cepa pGAP-laaa/B descrita en el folleto del documento de patente W2009/008377 está provista de solo la actividad de tiolasa para producir alcohol isopropílico, y no se ha llevado a cabo el potenciamiento de tanto la actividad de malato deshidrogenasa como la actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB). Por tanto, la cepa pGAP-laaa/B no se estudia en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico de la presente invención.

Se transfirió el producto de precultivo (45 ml) obtenido en un tanque de cultivo de 3 l de capacidad (BMS-PI: un aparato de cultivo fabricado por ABLE Corporation) que contenía 855 g de un medio de cultivo que tenía la composición mostrada a continuación, y se cultivó. El cultivo se realizó bajo presión atmosférica, a una velocidad de aireación de 0,9 l/min, una velocidad de agitación de 550 rpm, una temperatura de cultivo de 30 °C y pH 7,0 (ajustado con una solución acuosa de NH₃). Durante el periodo desde el inicio del cultivo hasta 8 horas a partir de entonces, se añadió una solución acuosa al 45 % p/p de glucosa a un caudal de 7,5 g/l/hora. Después de eso, se añadió la solución acuosa al 45 % p/p de glucosa a un caudal de 20 g/l/hora. Se muestreó algunas veces la solución de cultivo de células bacterianas durante el periodo desde el inicio del cultivo hasta 72 horas a partir de entonces, y se retiraron las células bacterianas por operación centrífuga. Se midieron por HPLC las cantidades de alcohol isopropílico acumuladas en el sobrenadante de cultivo obtenido y el agua de trampa según un método usual. Los valores de medición muestran el valor total de las cantidades de acumulación en la solución de cultivo y el agua de trampa (9 l) después del cultivo. Los resultados se muestran en la Fig. 1 y la Tabla 1. Además, las velocidades de producción, los rendimientos y las cantidades de alcohol isopropílico acumulados se muestran todos en la Fig. 2.

Los valores en la Tabla 1 se dan en g/l. Los símbolos en la Fig. 1 se definen como sigue:

Círculo negro: cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt;

Cuadrado negro: cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB;

Círculo blanco: cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB;

Triángulo blanco: cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB;

Cuadrado blanco: cepa pGAP-laaa/B::pnt;

x: cepa pGAP-laaa/B;

Rombo blanco: cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB::pnt; y

Rombo negro: cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt.

<Composición del medio de cultivo>

Extracto soluble de maíz (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.): 20 g/l

Fe₂SO₄ · 7H₂O: 0,1 g/l

K₂HPO₄: 2 g/l

KH₂PO₄: 2 g/l

MgSO₄ · 7H₂O: 2 g/l

(NH₄)₂ SO₄: 2 g/l

ADEKANOL LG126 (Asahi Denka Co. Ltd.): 0,1 g/l

(Resto: agua)

5

[Tabla 1]

Tiempo (h)	Cepa pGAP-laaa/B	Cepa pGAP-laaa/B::pntA	Cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB	Cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB	Cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB	Cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB::pnt	Cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt	Cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,4	0,1	0,3	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
6	1,4	0,7	0,3	0,2	0,0	0,5	0,4	1,2
9	2,4	2,7	3,5	2,1	4,1	3,1	2,4	4,9
24	13,3	15,7	26,4	16,7	31,5	22,0	26,1	32,7
30	16,6	25,6	24,7	26,7	41,5	36,0	42,7	48,7
48	24,4	36,8	53,6	48,9	65,9	53,6	50,5	80,4
54	28,4	42,2	58,7	49,8	72,5	84,0	80,6	81,4
72	34,7	59,6	70,7	72,7	82,5	83,5	80,6	97,4

[Tabla 2]

Nombre de cepa	Cepa pGAP-laaa/B	Cepa pGAP-laaa/B::pntA	Cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB	Cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB	Cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB	Cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB::pnt	Cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt	Cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt
Velocidad de producción (g-IPA/l/h)	0,6	0,9	1,0	1,2	1,4	1,1	1,16	1,9
Rendimiento (moles-IPA/moles-glucosa) %	30,9	28,1	42,7	39,6	67,1	50,9	45,5	65,6
Cantidad de acumulación (g-IPA/l)	34,7 (72 h)	59,6 (72 h)	70,7 (72 h)	72,7 (72 h)	82,5 (72 h)	80,5 (72 h)	83,5 (72 h)	97,4 (72 h)

10 Como se muestra en estos resultados, la cepa (cepa pGAP-laaa/B::pntA) en la que solo se potenció la expresión del gen de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) (pnt) en la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico convencional (cepa pGAP-laaa/B), la cepa (cepa pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB) en la que solo se potenció la expresión del gen de tiolasa (atoB) por tanto la introducción como el potenciamiento genómico en la cepa pGAP-laaa/B convencional y la cepa (cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB) en la que solo se potenció la expresión del gen de malato deshidrogenasa (maeB) en la cepa pGAP-laaa/B convencional mostraron todas mayor productividad que la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico convencional, y las cantidades respectivas de acumulación de alcohol isopropílico fueron aproximadamente 1,7 veces, aproximadamente, 2,0 veces y aproximadamente 2,1 veces de las de la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico convencional, respectivamente. En la cepa (cepa pGAP-la-maeB/B::atoDAB) en la que solo se potenció la expresión del gen de malato deshidrogenasa (maeB), se redujeron los subproductos tales como acetona, ácido fórmico y ácido acético.

15 Además, la cepa (cepa pGAP-la-maeB-gapP-atoB/B::atoDAB) en la que se potencian tanto atoB como maeB, la cepa (pGAP-la-maeB/B::atoDAB::pnt) en la que se potencia la expresión de tanto maeB como pnt, la cepa (pGAP-la-gapP-atoB/B::atoDAB::pnt) en la se potencian atoB y pnt, y la cepa en la que se potencia la expresión de los tres genes de enzima: atoB, maeB y pnt mejoraron además la productividad de alcohol isopropílico. Las cantidades respectivas de acumulación de alcohol isopropílico fueron aproximadamente 2,4 veces, aproximadamente 2,3 veces, aproximadamente 2,4 veces y aproximadamente 2,8 veces de las de *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico convencional, respectivamente. Particularmente, en el caso en que se potenció simultáneamente la expresión de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) (pnt), el gen de tiolasa (atoB) y el gen de malato deshidrogenasa (maeB), la velocidad de producción fue 3,4 veces de la de la cepa pGAP-laaa/B, el rendimiento fue 2,1 veces del de la cepa pGAP-laaa/B y la cantidad de acumulación de alcohol isopropílico fue 2,8 veces de la de la cepa pGAP-laaa/B, que son mejoras espectaculares.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> Bacteria productora de alcohol isopropílico con alta productividad

<130> MT-F03090-00
 <150> JP2010-052249
 5 <151> 09-03-2010
 <160> 20
 <170> PatentIn versión 3.1
 10 <210> 1
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 1
 20 cgctcaattgcaatgattgacacgattccg 30
 <210> 2
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 2
 30 acagaattcgctattttagtgaataaaagg 32
 <210> 3
 <211> 42
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 3
 gcagcaattgctggtggaacatatgcgaattggcataccaag 42
 <210> 4
 <211> 33
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 4
 ggacaagcttaattttgcggaacatttcagc 33
 <210> 5
 <211> 27
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> cebador
 <400> 5
 atggtaccgcagtaatacgtggtgc 27
 65 <210> 6
 <211> 33

ES 2 741 637 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 6
 cctctagactccatcggtttattgatgatgg 33

 10 <210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 7
 ggtctagagcaatgattgacacgattccg 29

 20 <210> 8
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 8
 cgaattcgctggtggaacatatgaaaacaaattgatgacattacaagac 50

 30 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> cebador

 <400> 9
 gcggtacctatttgctctctgtgaaacg 30

 40 <210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> cebador

 <400> 10
 gctctagatgctgaaatccactagtctgtc 31

 50 <210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> cebador

 <400> 11
 tactgcagcgtccagcaccttatcaacc 29

 60 <210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 741 637 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5
 <400> 12
 ggtctagagcaatgattgacacgattccg 29
 <210> 13
 10 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 13
 aatgatcatgctggtggaacatatgaaaggtttgcaatgctagg 45
 20 <210> 14
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 14
 30 gcggatccctcgagttataataataactactgctttaattaagtc 44
 <210> 15
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 15
 40 cactcgaggctggtggaacatatgttaaaggatgaagtaattaacaaattagc 54
 <210> 16
 <211> 61
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <400> 16
 ggaattcggg accgctgact cttagaggatc cttacttaag ataatcatat ataacttcag 60
 c 61
 <210> 17
 55 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> cebador
 <400> 17
 cgggatccttaattcaaccggtcaatcac 29

ES 2 741 637 T3

5 <210> 18
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador

10 <400> 18
ttccatatgaaaaattgtgcatcgtc 27

15 <210> 19
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

20 <400> 19
cgggatcccggagaaagtcatatggatgaccagttaaacaag 44

25 <210> 20
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 20
gctctagattacagcgggtgggttgcgc 29

REIVINDICACIONES

1. Una *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico que comprende un sistema de producción de alcohol isopropílico en el que cuatro actividades enzimáticas - una actividad de acetoacetato descarboxilasa, una actividad de alcohol isopropílico deshidrogenasa, una actividad de CoA transferasa y una actividad de tiolasa - se introducen desde fuera de la célula bacteriana, o la expresión de las cuatro actividades enzimáticas se potencia en la célula bacteriana, o se llevan a cabo ambos de estos, y en donde:
- (i) la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico comprende además al menos una actividad enzimática potenciada seleccionada de una actividad de malato deshidrogenasa potenciada y una actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) potenciada; y
- (ii) la velocidad de producción y el rendimiento de producción de alcohol isopropílico se incrementa por la actividad potenciada de malato deshidrogenasa y/o NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB),
- en donde la actividad enzimática potenciada es de al menos uno de potenciamiento por un gen de enzima introducido desde fuera de la célula de *Escherichia coli* o potenciamiento por expresión potenciada de un gen de enzima en la célula de la *Escherichia coli*.
2. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 1, en donde la actividad enzimática potenciada comprende la actividad de malato deshidrogenasa potenciada.
3. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 2, que comprende además actividad de tiolasa potenciada.
4. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 1, en donde la actividad enzimática potenciada comprende la actividad de malato deshidrogenasa potenciada y la actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) potenciada.
5. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 4, que comprende además actividad de tiolasa potenciada.
6. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la actividad enzimática potenciada es de al menos uno de potenciamiento en el genoma de una *Escherichia coli* hospedadora o potenciamiento por introducción de plásmido.
7. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la actividad enzimática potenciada es de un gen o genes de una bacteria o bacterias del género *Escherichia* y que codifica la enzima o enzimas.
8. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde los genes de cada una de las enzimas acetoacetato descarboxilasa, alcohol isopropílico deshidrogenasa, CoA transferasa y tiolasa son independientemente de al menos un procarionte seleccionado del grupo que consiste en una bacteria del género *Clostridium*, una bacteria del género *Bacillus* y una bacteria del género *Escherichia*.
9. La *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según la reivindicación 8, en donde la actividad de acetoacetato descarboxilasa es de un gen que es de *Clostridium acetobutylicum* y codifica la enzima; la actividad de alcohol isopropílico deshidrogenasa es de un gen que es de *Clostridium beijerinckii* y codifica la enzima; y la actividad de CoA transferasa, la actividad de tiolasa, la actividad de malato deshidrogenasa y la actividad de NAD(P)⁺ transhidrogenasa (específica de AB) son de genes que son de *Escherichia coli* y codifican las enzimas respectivas.
10. Un método de producción de alcohol isopropílico que comprende producir alcohol isopropílico a partir de un material de partida derivado de planta usando la *Escherichia coli* productora de alcohol isopropílico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. El método según la reivindicación 10, que comprende además recuperar el alcohol isopropílico en el estado de solución acuosa y deshidratar el alcohol isopropílico.
12. Uso de una *Escherichia coli* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para producir alcohol isopropílico a partir de material de partida derivado de planta.

FIG.1

