

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2011/086211 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
21 de julio de 2011 (21.07.2011)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C12N 1/06 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2010/070858

(22) Fecha de presentación internacional:  
21 de diciembre de 2010 (21.12.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 200931258  
23 de diciembre de 2009 (23.12.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];  
C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):  
**MARTÍNEZ LÓPEZ, Virginia** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **DÍAZ FERNÁNDEZ, Eduardo** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **GARCÍA GONZÁLEZ, Pedro** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **GARCÍA LÓPEZ, José Luís** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **DUQUE MARTÍN DE OLIVA, Estrella** [ES/ES]; Estación Experimental del Zaidin (EEZ), C/ Profesor Albareda, 1, E-18008 Granada (ES). **RAMOS MARTÍN, Juan Luís**

[ES/ES]; Estación Experimental del Zaidin (EEZ), C/ Profesor Albareda, 1, E-18008 Granada (ES). **PRIETO JIMÉNEZ, María Auxiliadora** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: CELLULAR AUTOLYSIS SYSTEM FOR PROCESSING BACTERIAL BIOMASS IN THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES IN *PSEUDOMONAS PUTIDA* KT2440

(54) Título : SISTEMA DE AUTOLISIS CELULAR PARA EL PROCESADO DE LA BIOMASA BACTERIANA EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN *PSEUDOMONAS PUTIDA* KT2440

(57) Abstract: The present invention relates to a bacterial strain of *Pseudomonas putida* KT2440, which includes a lytic heterologous genetic system in which said system in turn includes the nucleotide sequence that encodes the lytic enzyme with endolysin cell wall Ejl, the nucleotide sequence that encodes holin Ejh, and a nucleotide sequence that encodes a gene regulation system, which in turn includes a nucleotide sequence promoting the gene expression, and a nucleotide sequence that encodes and expresses a protein regulating said gene expression. The strain is preferably the microorganism with deposit number CECT 7659. The present invention further relates to said strain in which the *Pseudomonas putida* KT2440 microorganism is mutant in one or more of the tol-pal genes. Said strain is preferably the microorganism with deposit number CECT 7658. The present invention further relates to the use of any of the described strains for extracting polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesised by said bacterium as well as to a method for extracting said compound.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende la secuencia nucleotídica que codifica la enzima lítica de pared celular endolisina Ejl, la secuencia nucleotídica que codifica la holina Ejh, y una secuencia nucleotídica que codifica un sistema de regulación génica, que a su vez comprende una secuencia nucleotídica promotora de la expresión génica, y una secuencia nucleotídica que codifica y expresa una proteína reguladora de dicha expresión génica. Preferiblemente la cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7659. Además, la presente invención también se refiere a dicha cepa donde el microorganismo *Pseudomonas putida* KT2440 es mutante en uno o más de los genes tol-pal. Preferiblemente dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7658. Además, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las cepas descritas para la extracción de polihidroxialcanoato (PHA) sintetizado por dicha bacteria así como a un método para la extracción de dicho compuesto.

WO 2011/086211 A1



---

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))* — *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

**SISTEMA DE AUTOLISIS CELULAR PARA EL PROCESADO DE LA BIOMASA BACTERIANA EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN *PSEUDOMONAS PUTIDA* KT2440.**

5 La presente invención se refiere a una cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende la secuencia nucleotídica que codifica la enzima lítica de pared celular endolisina Ejl, la secuencia nucleotídica que codifica la holina Ejh, y una secuencia nucleotídica que codifica un sistema de  
10 regulación génica, que a su vez comprende una secuencia nucleotídica promotora de la expresión génica, y una secuencia nucleotídica que codifica y expresa una proteína reguladora de dicha expresión génica. Preferiblemente la cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7659. Además, la presente invención también se refiere a dicha cepa donde el microorganismo  
15 *Pseudomonas putida* KT2440 es mutante en uno o más de los genes *tol-pal*. Preferiblemente dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7658. Además, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las cepas descritas para la extracción de polihidroxicanoato (PHA) sintetizado por dicha bacteria así como a un método para la extracción de dicho  
20 compuesto.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

25 La tecnología de los bioprocesos ha experimentado en los últimos años un avance considerable tratando de mejorar y adaptar la moderna biotecnología a las tecnologías clásicas de fermentación. En este sentido, la tecnología del DNA recombinante o, en un concepto más amplio, las técnicas de biología molecular, han sido determinantes para que se pueda explotar y manipular un gran número de organismos para la producción de compuestos de interés. En  
30 gran medida, este éxito ha sido posible gracias al desarrollo de sistemas de expresión de genes en organismos heterólogos más fáciles de manipular y multiplicar. Dentro de las diferentes opciones que se pueden estudiar, cabe

destacar aquéllas que no sólo pretenden la expresión de un gen o conjunto de genes sino que, además, tratan de facilitar la obtención de un producto de interés biotecnológico y de alto valor añadido, como son los biopolímeros plásticos o bioplásticos. Sin embargo, el uso de este tipo de biopolímeros no se ha implantado hasta ahora en el mercado de forma competitiva debido al bajo coste que aún mantiene la síntesis de los polímeros plásticos derivados del petróleo (Prieto *et al.* 2007. *Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates*. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer. 397–428).

5

10 Actualmente, como consecuencia del problema de contaminación medioambiental que ha generado el uso del plástico convencional y el incremento del precio del petróleo, se está haciendo una apuesta clara por la implantación de procesos de tipo sostenible para la obtención de energía y la producción de materiales de alto consumo como son los biopolímeros plásticos, y en particular los polihidroxicanoatos (PHAs) (Gavrilescu *et al.* (2005). *Biotechnology Advances*, 23: 471-499).

15

Los PHAs, conocidos comúnmente como “bioplásticos”, son polímeros biodegradables producidos por ciertas bacterias, que se acumulan en el interior celular en forma de gránulos de reserva de fuente de carbono cuando las condiciones de cultivo no son óptimas para el crecimiento (Madison y Huisman, 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 21-53; Prieto *et al.* 2007. *Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates*. In *Pseudomonas: a Model System in Biology*. *Pseudomonas*, vol. V, Eds, Ramos, J. L. y Filloux, A. Springer, 397–

20

25 428). Estos biopolímeros son biodegradables y las bacterias los sintetizan a partir de fuentes renovables como por ejemplo la glucosa, la fructosa o los ácidos grasos que forman parte de los aceites vegetales. Por tanto, se puede definir el término bioplástico como biopolímero sintetizado a partir de fuentes renovables, que puede ser biodegradado en condiciones controladas y que

30

presenta características físico-químicas similares a los plásticos derivados de la industria petroquímica (Sarasa *et al.* 2009. *Bioresour. Technol.* 100: 3764–3768).

En general, los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster (93-97% del peso seco del gránulo [PSG]) rodeado por fosfolípidos (1-6% del PSG) y proteínas asociadas al gránulo (GAPs) (1-2% del PSG), las cuales forman una fina capa en la superficie del gránulo (Steinbüchel *et al.* 1995. *Can. J. Microbiol.*, 41: 94-105). Hasta el momento se han definido tres clases de GAPs en bacterias: i) las PHA sintasas, involucradas en la polimerización del PHA, ii) las PHA despolimerasas, responsables de la degradación del bioplástico y iii) las fasinias, las GAPs más abundantes, con una función estructural o reguladora (Prieto *et al.* 1999a. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3265-3271; 5  
10 Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212).

Los PHAs se clasifican en dos tipos principales de acuerdo a su estructura química: los PHAs de cadena corta (scl-PHAs) obtenidos a partir de monómeros con 4 o 5 átomos de carbono y los de cadena media (mcl-PHAs) 15  
procedentes de monómeros con 6 a 14 átomos de carbono. Los diferentes PHAs identificados hasta la fecha son polímeros lineales compuestos de 3-hidroxiácidos grasos exclusivamente de la configuración *R* (RHAs). El peso molecular de estos polímeros varía entre 50.000-1.000.000 y su diversidad radica en las sustituciones en el carbono asimétrico en posición 3, que le 20  
confiere al polímero el carácter quiral (Prieto *et al.* (1999b) *J. Bacteriol.* 181: 858-868).

Es conocido que la composición del polímero depende de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo utilizado durante la fermentación de la bacteria 25  
productora (Durner, *et al.* 2001. *Biotechnol. Bioeng.*, 72: 278-288, Jung *et al.* 2001. *Biotechnol. Bioeng.*, 72: 19-24). Por otra parte, es importante resaltar que las características físico-químicas de los polímeros varían según la naturaleza química de los monómeros que los componen (Madison y Huisman, 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 21-53; Kessler *et al.*, 2001. *J. Biotechnol.*, 86: 97- 30  
104). Teniendo en cuenta que se han descrito más de 140 RHAs diferentes como componentes de los PHAs producidos por bacterias (Steinbüchel *et al.* 1995. *Can. J. Microbiol.*, 41: 94-105; Sudesh *et al.* 2000. *Prog. Polym. Sci.*, 25:

1503-1555), y que el biopolímero después de su obtención por fermentación puede ser sometido a posteriores modificaciones químicas, como a su entrecruzamiento y a la adición de grupos funcionales (Lageveen, R. G. *et al.*, 1988. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2924-2932.), es fácil imaginar la gran  
5 diversidad de bioplásticos y RHAs diferentes que pueden generarse mediante la combinación de todos estos procesos. Es importante señalar que los PHAs también pueden ser útiles para aplicaciones biomédicas como biomateriales (Zinn *et al.* 2001. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 53: 5-21). Además, el PHA puede ser considerado como una fuente de nuevos compuestos quirales (sintones) de  
10 gran utilidad como precursores en la industria farmacéutica, ya que son difíciles de conseguir en estado puro mediante procesos químicos convencionales.

En la producción de los PHAs mediante fermentación bacteriana, el proceso de extracción de los mismos es probablemente el paso más importante desde el  
15 punto de vista del ahorro de costes de producción y del desarrollo de un proceso de fabricación respetuoso con el medio ambiente. Hasta ahora se han desarrollado diferentes métodos para extraer el PHA de las bacterias productoras pero en su mayoría requieren el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, cócteles enzimáticos o detergentes (Elbahloul Y, Steinbüchel A, 2009. *Appl Environ Microbiol.*, 75: 643-51).  
20

Por otra parte, la mayoría de los bacteriófagos (o fagos abreviadamente), con excepción de los filamentosos, son líticos y rompen la pared de la bacteria huésped hasta su lisis completa. Aunque hay más de una estrategia para llevar  
25 a cabo este proceso, la gran mayoría de los fagos se valen de dos proteínas que actúan de manera perfectamente coordinada: una holina y una endolisina. Los genes que codifican estas proteínas suelen estar contiguos y su transcripción y traducción es tardía, iniciándose sólo cuando los viriones están en su última fase de empaquetamiento dentro del citoplasma bacteriano. Las  
30 holinas constituyen un grupo de proteínas fágicas de estructura primaria muy variada pero que se agrupan en tres clases y funcionalmente son muy similares en su modo de acción. Son proteínas pequeñas, con dominios

transmembranales que se localizan en la membrana citoplásmica formando un poro o agujero (“hole”) que en un momento genéticamente programado permite el paso de la enzima lítica (endolisina) encargada de romper la pared bacteriana y provocar la lisis (Wang *et al.* (2000) *Annu. Rev. Microbiol* 54: 799-825). Las endolisinas son enzimas líticas codificadas por los fagos, no tienen péptido señal de secreción, se acumulan en el citoplasma durante el ciclo vegetativo y se translocan a la pared celular a través del poro formado por la oligomerización de la holina. Una vez en la pared celular, se unen al peptidoglicano, rompen enlaces específicos y desencadenan la lisis bacteriana y la posterior liberación de la progenie fágica. Dependiendo del tipo de enlace que hidrolicen, las endolisinas pueden ser muramidasa, glucosaminidasa, transglicosilasa, amidasa o endopeptidasa (Hermoso *et al.* (2007) *Curr. Op. Microbiol.* 10: 461-472).

Por otra parte, el complejo Tol-Pal de las bacterias está organizado en dos complejos proteicos: un complejo de la membrana interna que consiste en las proteínas TolQ, TolA y TolR que interactúan entre ellas mediante dominios transmembrana, y otro complejo asociado a la membrana externa compuesto por las proteínas TolB y Pal, que también interactúa con Lpp, OmpA y el peptidoglicano (Lazzaroni *et al.* 1999. *FEMS Microbiol. Lett.*, 177: 191–197). Estas proteínas se localizan formando complejos en la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas, y son críticas para el mantenimiento de la estructura de la envuelta. La alteración de las mismas, conduce a situaciones de debilitamiento de la célula e incrementada sensibilidad a detergentes o agentes quelantes (Llamas *et al.* 2000. *J. Bacteriol.*, 182: 4764–4772).

Es conocido que la extracción de los polihidroxicanoatos producidos por una bacteria puede hacerse directamente sin lisar previamente la bacteria mediante el empleo de solventes orgánicos a elevada temperatura. Sin embargo este proceso es peligroso, energéticamente poco eficiente y medioambientalmente muy contaminante. Por este motivo para liberar los gránulos de bioplástico antes de su extracción se recurre también a la lisis previa de la bacteria

mediante procedimientos físicos de ruptura de las células bacterianas o mediante procedimientos químicos de lisis celular con la ayuda de detergentes. Sin embargo, los procedimientos físicos de ruptura requieren del empleo de un equipamiento complejo y costoso además de un gasto de energía, y los procedimientos químicos necesitan del uso de altas cantidades de detergente que son medioambientalmente contaminantes. Por consiguiente un objetivo de esta invención consistió en desarrollar un procedimiento de lisis celular confiriendo nuevas propiedades a los microorganismos productores del polihidroxialcanoato de tal manera que la extracción de estos compuestos fuera menos costosa energéticamente y medioambientalmente menos contaminante.

La complejidad de los procesos de extracción resultantes de la fermentación de las bacterias supone un obstáculo a la hora de reducir tanto los costes de producción como la contaminación medioambiental a la hora de escalar el proceso a nivel industrial. Por todo ello, el desarrollo de nuevos métodos o procesos para la producción y extracción de PHAs de las bacterias de forma competitiva y ecológica, se ha convertido en un objetivo fundamental para esta actividad industrial.

20

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende la secuencia nucleotídica que codifica la enzima lítica de pared celular endolisina Ejl, la secuencia nucleotídica que codifica la holina Ejh, y una secuencia nucleotídica que codifica un sistema de regulación génica, que a su vez comprende una secuencia nucleotídica promotora de la expresión génica, y una secuencia nucleotídica que codifica y expresa una proteína reguladora de dicha expresión génica. Preferiblemente la cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7659. Además, la presente invención también se refiere a dicha cepa donde el microorganismo

30

*Pseudomonas putida* KT2440 es mutante en uno o más de los genes *tol-pal*. Preferiblemente dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7658. Además, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las cepas descritas para la extracción de polihidroxialcanoato (PHA) sintetizado por dicha bacteria así como a un método para la extracción de dicho compuesto.

En la presente invención, se ofrece una solución a la extracción de compuestos producidos por la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440, y particularmente la extracción de polihidroxilacanoatos disminuyendo con ello el uso de productos químicos contaminantes utilizados para lisar las células productoras. En los ejemplos de la presente invención se muestran los resultados de la autólisis celular en dos cepas bacterianas depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las dos cepas comprenden un sistema genético heterólogo lítico que expresa genes implicados en la degradación de la pared celular y en la permeabilidad de la membrana celular, cuya expresión se encuentra controlada por un sistema regulador de la expresión dependiente de un inductor.

Es conocido que cuando las células bacterianas portan un sistema genético heterólogo lítico en multicopia, principalmente en forma de plásmido, las células se hacen muy inestables porque se lisan incluso en ausencia de inductor, crecen poco y lo hacen lentamente, y por lo tanto son poco útiles para la producción de sustancias de interés. Por consiguiente, una parte de esta invención consistió en estudiar el comportamiento de estas cepas cuando portan este sistema genético heterólogo lítico en una única copia integrada en el cromosoma. En este caso el comportamiento de la cepa bacteriana no se conocía y por consiguiente no se podía predecir con exactitud el resultado. Al reducir el número de copias del sistema lítico podría esperarse que el sistema lítico se volviese menos agresivo para la célula y por lo tanto la célula fuese más estable. Pero también podría esperarse que la célula no se lisara y por consiguiente el sistema fuese inservible para el objetivo propuesto. Al mismo

tiempo, dada la naturaleza heteróloga del sistema y teniendo en cuenta que podría insertarse en cualquier parte del cromosoma, también podría esperarse que aun reduciendo a una sola copia el número de copias del sistema lítico heterólogo, la célula fuese igualmente inestable.

5

En el caso de esta invención las dos cepas anteriormente descritas y depositadas en la CECT portan el sistema genético heterólogo lítico en monocopia.

10 Dentro de las distintas opciones de comportamiento que cabría esperar se observó que la cepa recombinante CECT 7659 que portaba el sistema genético heterólogo lítico en monocopia era más estable que la cepa nativa transformada con el plásmido que portaba el sistema lítico en multicopia.

15 Es conocido que las mutaciones en los genes *tol-pal* causan inestabilidad de la membrana celular externa en la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 y permite que las proteínas periplásmicas se secreten y la bacteria se lise en presencia de algunos detergentes y EDTA. Por ello se pensó que esta mutación podría ser útil para inducir la lisis por detergente y EDTA en las  
20 células productoras de PHAs. Sin embargo, la presencia de PHA en lugar de desestabilizar la célula mutante en los genes *tol-pal* hacía que la célula fuese más estable e insensible a la lisis por el detergente y el agente quelante EDTA. Por lo tanto dicha mutación resultaba inservible para el objetivo propuesto.

25 Aunque la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 mutante en los genes *tol-pal* no resultaba ser útil individualmente para el objetivo propuesto, se analizó si la combinación de este sistema de lisis de la cepa mutante en los genes *tol-pal* con el sistema genético heterólogo lítico en monocopia de la presente invención, generaba algún efecto sinérgico inesperado que propiciara la lisis  
30 celular en las condiciones deseadas. Por este motivo se construyó una cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 y en concreto la cepa recombinante CECT 7658 que portaba el sistema genético heterólogo lítico en monocopia en la cepa de

*Pseudomonas putida* KT2440 mutante en uno de los genes *tol-pal*. De forma inesperada en esta nueva cepa recombinante se consiguió mejorar la lisis de forma controlada y por lo tanto se mejoró el proceso de extracción de los compuestos producidos, y en concreto la extracción del PHA.

5

Las razones precisas que explican este comportamiento son aun desconocidas, pero se puede especular con la posibilidad de que dicha mutación *tol-pal* provoca un debilitamiento de la membrana celular externa, que en condiciones normales no es suficiente para inducir la lisis, pero que en presencia del sistema genético herterólogo en monocopia, que por si solo tampoco es capaz de inducir la lisis, complementa de forma sinérgica la acción de este último sobre la pared celular y la membrana celular interna. De esta manera, en presencia de ambos sistemas y tras la adición de un inductor, de una pequeña cantidad de un detergente y de un agente químico quelante, la lisis se produce de forma más rápida y contundente, y además de forma controlada por el inductor. Se genera así un efecto sinérgico de tipo umbral, *a priori* imprevisible, de tal manera que hasta que no se combinan todos los elementos de forma precisa no se supera el umbral de desestructuración de la envoltura celular necesario para la lisis y por lo tanto la célula permanece perfectamente viable. En estas condiciones, la liberación de los compuestos contenidos en el citoplasma celular se produce con una alta eficiencia en presencia de un detergente y un agente quelante sólo cuando se induce el sistema genético heterólogo lítico en monocopia convirtiéndose así la nueva cepa recombinante creada (CECT 7658) en un nuevo organismo muy útil para el objetivo propuesto.

25

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende la secuencia nucleotídica que codifica una enzima lítica de pared celular, la secuencia nucleotídica que codifica una holina, y un sistema regulador de la expresión génica.

30

La enzima lítica de pared celular es una proteína capaz de romper la pared de la célula o las sustancias que componen dicha pared. Dicha enzima lítica puede proceder de bacterias, hongos, levaduras, plantas, animales o bacteriófagos. Preferiblemente la enzima lítica de pared celular se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, Ejl del bacteriófago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*, Cpl-1 del bacteriófago Cp-1 de *Streptococcus pneumoniae*, transglicosidasa R del bacteriófago  $\lambda$  de *Escherichia coli*, lisozimas del bacteriófago P22 de *Salmonella* y del bacteriófago T4 de *Escherichia coli*, proteína E del bacteriófago  $\phi$ X174 de *E. coli*, transglicosidasa Slt y amidasa AmiA de *Escherichia coli* (Young, R. 1992. Microbiol. Rev. 56:430-481).

La holina es una proteína fágica con dominios transmembranales que se localiza en la membrana citoplásmica formando un poro que permite el paso de la enzima lítica encargada de romper la pared bacteriana y provocar la lisis. Las holinas tienen una estructura primaria muy variada pero se agrupan en tres clases y funcionalmente son muy similares en su modo de acción. Dicha holina procede de un bacteriófago. Preferiblemente dicha holina se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, Ejh del bacteriófago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*, Cph-1 del bacteriófago Cp-1 de *Streptococcus pneumoniae*, holina del bacteriófago  $\phi$ 6 de *Pseudomonas phaseolicola*, holina S del bacteriófago  $\lambda$  de *Escherichia coli*, holina del bacteriófago P22 de *Salmonella* (Young, R. 1992. Microbiol. Rev. 56:430-481).

La clasificación científica de la bacteria de la presente invención es: Reino: *Bacteria* / División: *Proteobacteria* / Orden: *Pseudomonadales* / Familia: *Pseudomonadaceae* / Género: *Pseudomonas* / Especie: *Pseudomonas putida*.

La secuencia completa del genoma de *Pseudomonas putida* KT2440 ha sido divulgada por Nelson *et al.*, (2002) (Nelson *et al.*, 2002. *Environ Microbiol.*, 4(12): 799-808). El N° de acceso de la secuencia completa de *Pseudomonas*

*putida* KT2440 es AE015451.1 y su identificación taxonómica (*Taxonomy ID*) es 160488.

El término “sistema genético heterólogo lítico” se refiere a una construcción genética que comprende secuencias nucleotídicas que corresponden a uno o más organismos diferentes de *Pseudomonas putida*. Por ejemplo, pero sin limitarse, la enzima lítica de pared celular y la holina pueden ser las secuencias nucleotídicas que codifican la secuencia aminoacídica de las proteínas que tienen dicha actividad, procedentes de fagos de *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus megaterium*. Preferiblemente dichas secuencias proceden del fago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*.

El término “sistema de regulación de la expresión génica” se refiere a un conjunto de secuencias nucleotídicas que regulan la expresión del “sistema genético heterólogo lítico” y pueden ser heterólogas o no, es decir, dichas secuencias pueden proceder o no de *Pseudomonas putida*. Es decir, dicho término hace referencia a un conjunto de secuencias nucleotídicas que tenga efecto sobre la funcionalidad de una secuencia nucleotídica respecto del comienzo de la transcripción o al inicio de traducción de una secuencia de ARN u otras secuencias. A modo de ejemplo, entre los sistemas reguladores de la expresión génica se encuentran los que se denominan sistemas reguladores inducibles que están constituidos por una o más secuencias nucleotídicas denominadas promotoras/operadoras y por una o más secuencias nucleotídicas que codifican y expresan una o más proteínas reguladoras que activan o reprimen la expresión génica en presencia de uno o más compuestos denominados inductores. Un ejemplo de activador de la expresión génica es la proteína XylS de *Pseudomonas putida* que pertenece a una familia de reguladores transcripcionales denominada XylS/AraC, implicadas en la estimulación de la transcripción de al menos 90 proteínas diferentes implicados en diferentes procesos celulares como el metabolismo del carbono, patogénesis y la respuesta ante agentes alquilantes en bacterias.

Preferiblemente la proteína reguladora de la expresión génica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, cualquier proteína que pueda actuar como regulador de la expresión génica en *Pseudomonas putida*.

- 5 Una realización preferida se refiere a la cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico, donde la enzima lítica de pared celular es la endolisina Ejl, la holina es la proteína Ejh, y el sistema regulador de la expresión génica es *xyl/Pm*. Las secuencias nucleotídicas que codifican la endolisina Ejl y la holina Ejh, pueden proceder, por ejemplo, pero sin limitarse, de fagos de *Streptococcus pneumoniae*,  
10 *Bacillus subtilis* o *Bacillus megaterium*. Preferiblemente dichas secuencias proceden del fago EJ-1 de *Streptococcus pneumoniae*. Dichas secuencias nucleotídicas pueden formar parte de un casete en el que la secuencia de *ejl* precede a la secuencia *ejh*, en el sentido 5' a 3'. La secuencia reguladora de la expresión génica, *xyl/Pm*, consiste en una secuencia nucleotídica que codifica y expresa la proteína XylS, un regulador de la transcripción del promotor del plásmido TOL que regula la expresión del promotor *Pm* de la ruta de degradación *meta*. La proteína XylS pertenece a la familia de reguladores de la transcripción XylS/AraC. En consonancia con la organización estructural de la proteína XylS, *Pm* tiene dos motivos llamados A y B, cuyas secuencias son TGCA y GGNTA, respectivamente. Estos motivos se repiten en el promotor *Pm* y como consecuencia los monómeros de la proteína XylS se unen a dichas repeticiones, activando la transcripción. Para la activación de la transcripción de la secuencia nucleotídica que quede aguas abajo de *xyl/Pm* es necesario el  
15 uso de un activador como por ejemplo, pero sin limitarse, el ácido 3-metilbenzoico (en lo sucesivo 3-MB).

- El sistema genético heterólogo lítico descrito en párrafos anteriores puede comprender además un marcador de resistencia que permita la selección de  
30 las bacterias que contienen dicho sistema. El uso de genes de resistencia antibiótica es una herramienta importante en la ingeniería genética en general. Los genes de resistencia a los antibióticos tienen la habilidad de desactivar

selectivamente ciertos antibióticos y, en consecuencia, proteger las células contra esos antibióticos. Un gen de resistencia antibiótica, por tanto, puede ser utilizado para delatar la existencia del sistema genético heterólogo lítico de la presente invención. En la práctica, el gen antibiótico es ligado a dicho sistema  
5 antes de ser transformado en la célula bacteriana receptora. Estas células son entonces incubadas en presencia del antibiótico. Sólo las células que se reproduzcan en estas condiciones son las que habrán incorporado el gen de resistencia al antibiótico junto con dicho sistema genético. Preferiblemente el marcador confiere resistencia a las células frente al antibiótico kanamicina.  
10 Además, el marcador puede conferir resistencia contra productos químicos o frente a la presencia de nutrientes no usuales.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a cualquier cepa bacteriana derivada de *Pseudomonas putida* KT2440, descrita en párrafos  
15 anteriores, donde dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7659. Dicho microorganismo ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos tipo (CECT) el día 16 de diciembre de 2009 le correspondió el nº de depósito CECT 7659. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia / Edificio de investigación  
20 / Campus de Burjassot / 46100 Burjassot (Valencia).

La cepa CECT 7659 comprende un sistema genético heterólogo lítico. Esta cepa posee integrados en el cromosoma los genes *ejh* y *ejl* que codifican una holina (*Ejh*) y una enzima lítica (*Ejl*) del bacteriófago EJ-1, respectivamente,  
25 bajo el control transcripcional del promotor *Pm* (cassette *ejh-ejl*, construcción reguladora *xylS/Pm* y un gen de resistencia a la kanamicina). La secuencia nucleotídica que codifica para la holina *Ejh* es SEQ ID NO: 1 y la secuencia que codifica para la endolisina *Ejl* es SEQ ID NO: 2 (casete *ejh-ejl*; Número de acceso NC\_005294.1), y la secuencia nucleotídica de los componentes del  
30 sistema regulador de la expresión génica *xyl/Pm* es SEQ ID NO: 5 para *Xyl* (Número de acceso NP\_542858) y SEQ ID NO: 6 para *Pm* (Número de acceso

X01103). En adelante, para referirse a dicha cepa CECT 7659 puede emplearse de forma indistinta el término KTHL.

Las condiciones de cultivo y de mantenimiento de la cepa CECT 7659, comunicadas a la Autoridad Internacional de depósito, son:

Condiciones de cultivo:

Crecimiento en medio rico LB (número 48 de medios de la CECT) suplido con kanamicina 50 µg/ml. Incubar en un agitador orbital a 300 rpm y a 30°C.

10

Condiciones de mantenimiento:

Crece en medio rico LB suplido con kanamicina 50 µg/ml durante 14 h en agitación a 30°C y guardar la cepa a - 80°C con glicerol 15 %.

15 Otra realización preferida se refiere a cualquier cepa derivada de la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 que comprende dicho sistema heterólogo lítico, donde dicha cepa bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2440, descrita en párrafos anteriores, es mutante en uno o más de los genes *tol-pal*. El término "mutante" tal como se emplea en la presente invención se refiere a la

20 secuencia resultante de la delección de los genes *tol-pal*. La célula de *Pseudomonas putida* KT2440 mutante en al menos uno o más de los genes *tol-pal* se selecciona de la lista que comprende *Pseudomonas putida* KT2440 AX (*tolA::xylE* que genera una proteína TolA acortada a 94 aminoácidos), *Pseudomonas putida* KT2440 BX (*tolB::xylE* que genera una proteína TolB acortada a 29 aminoácidos), *Pseudomonas putida* KT2440 QX (*tolQ::xylE* que genera una proteína TolQ acortada a 17 aminoácidos) o *Pseudomonas putida* KT2440 RX (*tolR::xylE* que no genera una proteína TolR porque el gen *tolR* está delecionado).

30 Una realización más preferida se refiere a la cepa descrita en el párrafo anterior, mutante en uno o más de los genes *tol-pal*, donde dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7658. La cepa CECT 7658

corresponde a la cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 BX (*tolB::xylE* que genera una proteína TolB acortada a 29 aminoácidos). Dicha cepa posee mutado el gen que codifica la proteína TolB del sistema Tol-Pal (*P. putida* KT2440 *tolB::xylE*, con TolB acortado a 29 aminoácidos). Además, posee integrados en el cromosoma los genes *ejh* y *ejl* que codifican una holina (Ejh) y una enzima lítica (Ejl) del bacteriófago EJ-1, respectivamente, bajo el control transcripcional del promotor *Pm* (cassette *ejh-ejl*, construcción reguladora *xylS/Pm* y un gen de resistencia a la kanamicina). Es decir, la cepa CECT 7658 además de presentar la mutación de los genes *tol-pal* comprende el sistema genético heterólogo lítico donde la secuencia nucleotídica que codifica para la holina Ejh es SEQ ID NO: 1, la secuencia que codifica para la endolisina Ejl (casete *ejh-ejl*) es SEQ ID NO: 2, y la secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia reguladora de la expresión génica *xyl/Pm* es SEQ ID NO: 5 para Xyl y SEQ ID NO: 6 para Pm. En adelante, para referirse a dicha cepa CECT 7658 puede emplearse de forma indistinta el término BXHL. Dicho microorganismo ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos tipo (CECT) el día 16 de diciembre de 2009 y le correspondió el nº de depósito CECT 7658. En adelante, para referirse a dicha cepa CECT 7658 puede emplearse de forma indistinta el término BXHL.

20

Las condiciones de cultivo y de mantenimiento de la cepa CECT 7658, comunicadas a la Autoridad Internacional de depósito, son:

Condiciones de crecimiento:

25 Crecimiento en medio rico LB (número 48 de medios de la CECT) suplido con kanamicina 50 µg/ml. Incubar en un agitador orbital a 300 rpm y a 30°C.

Condiciones de mantenimiento

30 Crecer en medio rico LB suplido con kanamicina 50 µg/ml durante 14 h en agitación a 30°C y guardar la cepa a - 80°C con glicerol 15 %.

El sistema genético heterólogo lítico se consigue introducir en las células mediante la transformación de vectores que contienen dicho sistema genético. La transformación puede dar lugar a una expresión transitoria de los genes de interés o a una expresión estable. La expresión estable permite que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada siga expresándose.

Otra realización preferida se refiere a cualquier cepa descrita en párrafos anteriores, donde el sistema genético heterólogo lítico está insertado en su ADN cromosómico. Una realización más preferida se refiere a dicha cepa donde el sistema genético heterólogo lítico insertado en su ADN cromosómico se encuentra en una sola copia.

Otro aspecto de la presente invención es una población microbiana que comprende cualquier cepa descrita en párrafos anteriores.

En adelante, para referirse a cualquier cepa descrita en párrafos anteriores o a la población microbiana que la comprende, se puede usar el término "microorganismo de la presente invención" o "microorganismo de la invención".

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por dicha bacteria. Puesto que la presente invención se centra en la inserción de un sistema genético heterólogo capaz de producir, de forma inducida, la lisis de las células que lo contienen, el microorganismo de la invención puede ser usado para la extracción de cualquier compuesto sintetizado por dicha bacteria. El hecho de que en la presente invención se haya medido la cantidad de PHA sintetizada por dicha bacteria no limita el tipo de compuesto sintetizado por la misma. Una realización preferida se refiere al uso del microorganismo de la invención para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por dicha bacteria, donde el compuesto sintetizado es polihidroxialcanoato (PHA). Cualquier microorganismo de la presente invención puede es utilizado para la

producción de PHA. El PHA producido es extraído de forma eficiente gracias a las características técnicas intrínsecas de cada una de las cepas descritas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la extracción de PHA sintetizado por el microorganismo de la invención, que comprende:

- 5 a) cultivar el microorganismo de la invención en un medio mínimo de cultivo,
- b) añadir un compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico al cultivo del paso (a), y
- 10 c) aislar el compuesto sintetizado por dicha bacteria.

El término “medio mínimo” tal como se emplea en la presente invención se refiere a un medio de cultivo con composición definida de sales minerales y un compuesto que la bacteria *Pseudomonas putida* pueda utilizar como fuente de carbono. Una realización preferida se refiere al uso del medio denominado 0.1 N M63, compuesto por 13.6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.5 mg  $\text{SO}_4\text{Fe} \times 7 \text{H}_2\text{O}$  por litro, tamponado a pH 7, y suplementado con 1 mM de  $\text{MgSO}_4$  y una solución de elementos traza (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212). La fuente de carbono puede ser cualquier compuesto que la bacteria *Pseudomonas putida* pueda utilizar como fuente de carbono. Preferiblemente, pero sin limitarse, cualquier molécula susceptible de ser transformada en hidroxialcanoil-CoA mediante el metabolismo bacteriano. Dicho medio es apropiado para que las células produzcan el compuesto de interés.

25 El “compuesto efector” tal como se emplea en la presente invención se refiere a un compuesto capaz de inducir la expresión de dicho sistema genético por medio del sistema regulador de la expresión génica. Al final de la etapa de crecimiento cuando ya se ha acumulado la suficiente biomasa y la bacteria ha producido el compuesto de interés se induce la expresión del casete con los dos genes líticos mediante la adición al medio de cultivo de dicho compuesto efector. De esta manera la actuación conjunta de la enzima lítica y la holina

30

conduce a la ruptura espontánea de la envoltura celular de la bacteria y la liberación de los compuestos de interés contenidos en el citoplasma celular.

El aislamiento del compuesto sintetizado por dicha bacteria, según el paso (c) del método, se lleva a cabo mediante técnicas que forman parte del conocimiento general común y por tanto, están disponibles a un experto en la materia. Por ejemplo, el aislamiento o recuperación del producto enzimático se lleva a cabo por ejemplo, pero sin limitarse, mediante precipitación de dicho producto con fraccionamiento salino, precipitación por calor, precipitación isoelectrónica, con disolventes orgánicos o con polímeros, con acetona fría o mediante cromatografía.

Una realización preferida se refiere al método para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por el microorganismo de la invención, donde además comprende un paso previo al paso (a) donde la cepa o población bacteriana se cultiva en un medio rico de cultivo. El término "medio rico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a un medio que contiene extracto de levadura u otras sustancias de composición compleja y poco definida que puedan servir como fuente de nutrientes y energía para el crecimiento del microorganismo. En una realización más preferida el medio rico es Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Dicho medio rico es apropiado para que las células se dividan pero no produzcan el compuesto de interés. Es decir, el método que se describe en esta realización preferida consiste en las siguientes etapas secuenciales:

- cultivar el microorganismo de la invención un medio rico de cultivo,
- cultivar los microorganismos obtenidos en el paso anterior en un medio mínimo de cultivo. Para ello puede aislarse el microorganismo de la invención o no. Preferiblemente el microorganismo de la invención se aísla por técnicas conocidas por el experto en la materia y se trasvasa a dicho medio mínimo de cultivo,

- añadir un compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico al cultivo del paso anterior,
- añadir compuestos químicos aceleradores de la lisis y
- aislar el compuesto sintetizado por dicha bacteria.

5

Otra realización preferida se refiere al método para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por el microorganismo de la invención, donde el compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico es el ácido 3-MB.

10

Otra realización preferida se refiere al método para la extracción de al menos un compuesto sintetizado por el microorganismo de la invención, donde además, después del cultivo del microorganismo de la invención, se adiciona al medio mínimo de cultivo, uno o más compuestos químicos, con propiedades detergentes y quelantes, en pequeñas cantidades que aceleran la lisis celular mediada por el sistema genético heterólogo lítico, pero que en dichas cantidades no son capaces de producir por sí solos la lisis de una bacteria nativa no modificada mediante el sistema genético heterólogo lítico. Las cantidades de compuestos químicos utilizados como aceleradores de la lisis son mucho más bajas que las cantidades que se necesitarían para lisar la bacteria si ésta no estuviese modificada genéticamente, y por lo tanto son menos contaminantes.

15

20

Según otra realización preferida del método para la extracción de PHA, donde además, después del cultivo del microorganismo de la invención, se adiciona un precursor de PHA al medio mínimo de cultivo. Una realización más preferida de la presente invención se refiere al método para la extracción de PHA, donde el precursor de PHA es un ácido graso o cualquier molécula susceptible de ser transformada en hidroxialcanoil-CoA mediante el metabolismo bacteriano.

25

30

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,

componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

**FIG. 1. Muestra un esquema de la clonación del casete *ejh-ejl* en el cromosoma de *Pseudomonas putida* KT2440 bajo el control transcripcional del promotor *Pm*.**

**FIG. 2. Muestra los perfiles de distribución obtenidos por ultracentrifugación con gradiente de sacarosa.**

Tubo 1: cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 sin inductor; tubo 2: cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 con inductor; tubo 3: cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL sin inductor; tubo 4: cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL con inductor. La banda blanca localizada en la interfase del gradiente de este último tubo corresponde a los gránulos de PHA liberados al medio extracelular.

**FIG. 3. Muestra el recuento de células viables (ufc/ml) a las 0, 6 y 24 h de las cepas *Pseudomonas putida* KTHL y *Pseudomonas putida* BXHL en presencia y ausencia de 3-MB.**

**FIG. 4. Muestra los perfiles de distribución obtenidos por ultracentrifugación con gradiente de sacarosa.**

Tubo 1: cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 incubada con EDTA 10 mM y SDS 0.1%; tubo 2: cepa recombinante *Pseudomonas putida* BXHL con 3-MB incubada con EDTA 10 mM y SDS 0.1%.

**FIG. 5. Muestra el contenido intracelular de PHA de la cepa *Pseudomonas putida* BXHL en presencia de 3-MB y en presencia de 3-MB, EDTA 10 mM y SDS 0.1 %.**

10

## **EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen el uso de la cepa de la invención para la extracción de cualquier compuesto sintetizado por las cepas de *Pseudomonas putida* KTHL y *Pseudomonas putida* BXHL, mutante en el sistema Tol-pal, portadoras del sistema lítico de la cepa KTHL.

**EJEMPLO 1. Construcción de la cepa de *Pseudomonas putida* KTHL y extracción de compuestos (PHA) sintetizados por las mismas.**

20

**1.1. Construcción de la cepa *Pseudomonas putida* KTHL portadora del casete lítico *ejh-ejl* en monocopia.**

Se ha diseñado un sistema de autólisis celular en *Pseudomonas putida* KT2440 mediante la construcción de una cepa portadora en el cromosoma de los genes que codifican una holina (Ejh) y una endolisina (Ejl). La cepa resultante se ha denominado *Pseudomonas putida* KTHL.

Para controlar la expresión del sistema lítico en *Pseudomonas putida* KT2440, se construyó un sistema de expresión en monocopia del casete *ejh-ejl* con el fin de introducirlo en el genoma de la cepa mediante conjugación triparental. Para

30

ello, se amplificó por PCR el fragmento de 1.209 pb utilizando el plásmido pEDF12 como molde (Tabla 4) y V08 y V09 como oligonucleótidos (Tabla 5). Dicho fragmento se digirió con *Xba*I y *Bam*HI y tras clonarlo en el plásmido pUC18Not se clonó en pCNB1 originando el plásmido pCNBHL (FIG. 1).

5 Mediante conjugación triparental con la cepa CC118 $\lambda$ pir (pCNBHL) se insertó en el cromosoma de *Pseudomonas putida* KT2440 un fragmento de DNA conteniendo el casete *ejh-ejl*, la construcción reguladora *xyIS/Pm* y un gen de resistencia a la kanamicina, dando lugar a la cepa *Pseudomonas putida* KTHL.

## 10 1.2. Cuantificación de la eficacia del sistema de lisis mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa para el aislamiento del gránulo (PHA).

Una vez finalizada la fermentación, las células de *Pseudomonas putida* KTHL se centrifugaron a 31.000  $\times$  g durante 1 h en una centrifuga Sorvall y los sedimentos se resuspendieron en tampón fosfato pH 8 para preservar la integridad celular. El 50% de cada muestra se liofilizó y se analizó por GC-MS para cuantificar el contenido total en PHA. El resto de la muestra se sometió a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa preformado con un primer

15 volumen de sacarosa al 20% (11 ml) y un segundo volumen de sacarosa al 15% (11 ml). Las muestras se colocaron en la parte superior del gradiente y se ultracentrifugaron a 126.000  $\times$  g durante 20 h en una ultracentrifuga XL-90 (Beckman). Los extractos se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso (Moldes *et al.*, 2004). Tras esta ultracentrifugación, se recogió con pipeta

20 Pasteur la banda blanca que aparece en el tercio superior del tubo; se observó al microscopio, se liofilizó y se analizó por GC-MS para determinar el contenido en PHA. Para cuantificar la cantidad de PHA presente en el interior celular, se recuperó el sedimento resultante de la ultracentrifugación, se liofilizó y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-

25 MS). Se cuantificó también el número de células viables (unidades formadoras de colonias por mililitro, ufc/ml) y la biomasa (gramos de PHA por litro, g/l). Todas las centrifugaciones y ultracentrifugaciones se llevaron a cabo a 4°C.

### 1.3. Estudio del comportamiento de la cepa *Pseudomonas putida* KTHL.

Para estudiar el efecto de la expresión de los genes líticos en el crecimiento y la integridad celular de *Pseudomonas putida* KTHL, se siguieron dos protocolos de crecimiento diferentes: i) crecimiento en una fase: la cepa se creció en un solo paso en condiciones de producción de PHA. Para ello, *Pseudomonas putida* KTHL y su cepa parental, *Pseudomonas putida* KT2440 se cultivaron en LB durante 14 h. Tras ese tiempo se lavaron con solución salina y se inocularon a DO<sub>600</sub> 0,3 en 100 ml de M63 0,1 N con octanoato 15 mM como única fuente de carbono y con el inductor (3-MB, 5 mM); ii) crecimiento en dos fases: Se inocularon 50 ml de LB a DO<sub>600</sub> 0,3 con preinóculos de ambas cepas. Después de 14 h de incubación los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en 100 ml de M63 0,1 N con octanoato 15 mM como única fuente de carbono y con el inductor (3-MB, 5 mM). Los cultivos se incubaron durante 23 h.

El crecimiento de las distintas cepas en condiciones de producción de plástico en una sola fase fermentativa permite crecer a partir de una única fuente de carbono (ácido octanoico) y alcanzar un alto rendimiento biomasa/PHA.

Antes de analizar la expresión de los genes líticos en *Pseudomonas putida* KTHL, se comprobó la capacidad de dicha cepa para crecer y producir PHA en un medio mínimo limitado en nitrógeno, con ácido octanoico como única fuente de carbono. *Pseudomonas putida* KTHL es capaz de crecer y acumular PHA en esas condiciones fermentativas a niveles de DO<sub>600</sub> similares a los de la cepa salvaje (Tabla 1). Este resultado fue confirmado mediante la cuantificación por GC-MS del contenido intracelular de PHA en las dos cepas. Esto demostró que la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL acumula similar a la producida por la cepa salvaje en las condiciones de crecimiento probadas (Tabla 1).

Cuando el inductor del sistema lítico (3-MB) está presente en el medio de cultivo se observó una inhibición en el crecimiento a niveles de  $DO_{600}$  de *Pseudomonas putida* KTHL, que no se observó en la cepa salvaje bajo las mismas condiciones. Estos resultados se confirmaron mediante la estimación de la viabilidad celular (ufc/ml) y de la biomasa (g/l) de la cepa salvaje y de la cepa recombinante sin y con 3-MB (Tabla 1).

**Tabla 1.** Muestra el valor de densidad óptica ( $\Delta_{600\text{ nm}}$ ); el contenido intracelular de PHA; el recuento de células viables (ufc/ml) y la biomasa (g/l) correspondientes a células crecidas en una fase fermentativa a las 23h de cultivo de la cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 y de la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL en presencia y ausencia de 3-MB.

	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> KT2440 + 3-MB	<i>P. putida</i> KTHL	<i>P. putida</i> KTHL + 3-MB
<b>DO<sub>600</sub> (23 h)</b>	6.7	6.3	6.43	4.13
<b>Contenido intracelular de PHA (g/l)</b>	0.93	0.86	1.07	0.83
<b>Biomasa (g/l)</b>	1.457	1.268	1.5	0.914
<b>Viabilidad (ufc/ml)</b>	2.13E+07	2.09E+07	2.65E+07	2.11E+06

Para determinar el rendimiento del sistema lítico en *Pseudomonas putida* KTHL, una vez finalizada la fermentación en una fase, las células se sometieron a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa. En el tubo con la muestra de *Pseudomonas putida* KTHL inducida con 3-MB se observó una banda blanca en la interfase del gradiente, indicando la secreción del plástico al medio extracelular. En ausencia del inductor, los gránulos de PHA no se secretaron al medio y sedimentaron junto con la fracción celular. En el caso de la cepa salvaje, no se secretaron gránulos en ningún caso. Estos resultados demuestran que los gránulos de PHA solo se liberan al medio extracelular en la cepa recombinante con el sistema lítico integrado en el cromosoma

(*Pseudomonas putida* KTHL) y en presencia del inductor de dicho sistema, demostrando la potencialidad de este sistema para los procesos de producción de PHA. Un inconveniente de este método de crecimiento y extracción de PHA es la incapacidad que presentan las células para sedimentar en el proceso de separación del plástico que ha sido secretado al medio, lo cual impide la cuantificación de la cantidad de PHA obtenido mediante GC-MS.

El crecimiento en dos fases fermentativas consiste en un nuevo sistema de fermentación/producción que permite una mejora en cuanto a la producción de PHA en *Pseudomonas putida* KTHL y en el funcionamiento del sistema de lisis. El procedimiento consiste en cultivar las células en un medio rico (medio LB) y a continuación traspasarlas a un medio específico de producción de PHA, donde se lisarán tras la activación del sistema lítico.

Bajo las condiciones de fermentación anteriormente descritas, *Pseudomonas putida* KTHL es capaz de crecer y acumular PHA de manera similar a la cepa salvaje en cuanto a los niveles de  $DO_{600}$  alcanzados por ambas cepas (Tabla 2). Este resultado fue confirmado mediante la cuantificación por GC-MS del contenido intracelular de PHA en las dos cepas, en presencia y ausencia del inductor (Tabla 2). Este resultado demostró nuevamente que la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL acumula una cantidad de PHA similar a la producida por la cepa salvaje.

Al igual que ocurre en las fermentaciones de una sola fase, cuando el inductor del sistema lítico está presente en el medio de cultivo se observa una inhibición en el crecimiento de *Pseudomonas putida* KTHL, que no se observa en la cepa salvaje bajo las mismas condiciones. Estos resultados también se confirmaron mediante la estimación de la viabilidad celular (ufc/ml) y la biomasa (g/l) de los cultivos (Tabla 2).

30

**Tabla 2.** Muestra el valor de densidad óptica ( $\Delta_{600\text{ nm}}$ ); el contenido intracelular de PHA; el recuento de células viables (ufc/ml) y la biomasa (g/l)

correspondientes a células crecidas en dos fases fermentativas a las 23h de cultivo de la cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 y de la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL en presencia y ausencia de 3-MB.

	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> KT2440 + 3-MB	<i>P. putida</i> KTHL	<i>P. putida</i> KTHL + 3-MB
<b>DO<sub>600</sub> (23 h)</b>	7.52	7.66	7.74	6.4
<b>Contenido intracelular de PHA (g/l)</b>	0.84	0.78	0.88	0.79
<b>Biomasa (g/l)</b>	2.38	2.26	2.45	2.28
<b>Viabilidad (ufc/ml)</b>	2.33E+09	3.16E+09	3.33E+09	5.15E+08

5

Para determinar el rendimiento del sistema lítico en *Pseudomonas putida* KTHL, una vez finalizada la fermentación, las células se sometieron a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa (FIG. 2). En el tubo con la muestra de *Pseudomonas putida* KTHL inducida con 3-MB (tubo 4) se observó una banda blanca en la interfase del gradiente, indicando la secreción del plástico al medio extracelular. En ausencia del inductor (tubo 3), los gránulos de PHA no se secretaron al medio y sedimentaron junto con la fracción celular. En el caso de la cepa salvaje, no se secretaron gránulos en ningún caso (tubos 1 y 2). Estos resultados demuestran que los gránulos de PHA sólo se liberan al medio extracelular en la cepa recombinante con el sistema lítico integrado en el cromosoma (*Pseudomonas putida* KTHL) y en presencia del inductor de dicho sistema, demostrando la potencialidad de este sistema para los procesos de producción de PHA.

Este mismo experimento se repitió de manera similar incluyendo una rotura total de la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL empleando la prensa de French (Aminco Corp.) a una presión de 20.000 *psi.*, para comparar el porcentaje de lisis obtenido mediante el sistema lítico con el porcentaje de lisis obtenido empleando la prensa de French.

Para llevar a cabo la cuantificación del sistema lítico desarrollado en esta patente se comparó el contenido en PHA presente en los sedimentos celulares resultantes de la ultracentrifugación tras inducir lisis celular. Este experimento permite la cuantificación indirecta del gránulo secretado al medio extracelular debida al sistema lítico o a la prensa de French.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el porcentaje de rotura obtenido tras la inducción del sistema lítico en la cepa recombinante es menor al 10% del obtenido con la prensa de French, donde la ruptura celular es prácticamente total. Con el objetivo de mejorar este rendimiento del sistema de lisis, se estudió la sensibilidad de las cepas a distintos agentes químicos.

#### **1.4. Sensibilidad de *Pseudomonas putida* KTHL frente a agentes químicos**

Los grados de sensibilidad de la cepa *Pseudomonas putida* KTHL frente a los agentes químicos dodecilsulfato sódico (SDS), desoxicolato (DOC) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron analizados con el objetivo de mejorar el rendimiento del proceso de extracción del bioplástico. Las células se incubaron durante 18 h a 30°C en medio LB y en medio LB suplido con EDTA 0,2 mM, DOC 0,1%-0,05% (p/v) ó SDS 0,01% (p/v). A estas concentraciones, la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL inducida con 3-MB presentó una sensibilidad frente a los agentes químicos, mientras que en esta misma cepa sin inductor y la cepa salvaje *Pseudomonas putida* KT2440 (sin y con inductor) no se observó ningún efecto en el crecimiento. Estos resultados indican una alteración significativa en la permeabilidad de la membrana externa de *Pseudomonas putida* KTHL, debida a la expresión de la holina y la enzima lítica. De la misma manera, se determinaron las concentraciones mínimas de EDTA, DOC y SDS que no alteran el crecimiento de *Pseudomonas putida* KTHL inducida con 3-MB, siendo éstas las siguientes: EDTA 0,05-01 mM, DOC 0,01% (p/v) y SDS 0.005% (p/v). También se determinaron las concentraciones de EDTA y DOC que alteran el, crecimiento de las cepa salvaje *Pseudomonas*

*putida* KT2440, siendo éstas las siguientes: EDTA 0,4 mM y DOC 0,1-0,2% (p/v).

Con el objetivo de mejorar el rendimiento del proceso de extracción del PHA, se analizaron los grados de sensibilidad de la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL frente a EDTA, DOC y SDS en medio de producción de plástico. Una vez finalizada la fermentación en dos fases, las células se incubaron durante 7 h a temperatura ambiente con EDTA 10 mM y SDS 0,1% simultáneamente. A estas concentraciones, la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL inducida con 3-MB presentó una sensibilidad similar que en ausencia de inductor y que la cepa salvaje. El hecho de no lograr la lisis de ninguna de las cepas a pesar de la alta concentración de los agentes químicos empleados, sugiere que la presencia del gránulo de PHA en el interior celular confiere resistencia a la bacteria.

15

**EJEMPLO 2. Construcción de cepas de *Pseudomonas putida* mutantes en el sistema Tol-pal, portadoras del sistema lítico de la cepa KTHL, y extracción de compuestos (PHA) sintetizados por las mismas.**

**2.1. Estudio de la expresión del sistema de autólisis celular en las cepas mutantes en el sistema Tol-pal, *Pseudomonas putida* AX, BX, QX y RX.**

Para mejorar la eficacia del sistema lítico en la producción de PHA, se testaron cepas mutantes en el complejo Tol-pal, que presentan la envoltura celular desestructurada.

En primer lugar se comprobó la capacidad de estas cepas mutantes (*Pseudomonas putida* AX, *Pseudomonas putida* BX, *Pseudomonas putida* QX y *Pseudomonas putida* RX) para crecer y acumular PHA de la misma manera que la cepa parental *Pseudomonas putida* KT2440. La cuantificación del contenido intracelular de PHA mediante GC-MS de las cepas

30

anteriormente descritas crecidas en dos fases fermentativas es similar, e incluso mayor, que la de la cepa parental. Los valores de contenido intracelular de PHA obtenidos para *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas putida* KTHL, *Pseudomonas putida* AX, *Pseudomonas putida* BX, *Pseudomonas putida* QX y *Pseudomonas putida* RX fueron 0.71 g/l, 0.88 g/l, 1.0 g/l, 0.82 g/l, 1.03 g/l y 0.87 g/l, respectivamente.

**2.2. Construcción de cepas de *Pseudomonas putida* KT2440 mutantes en el sistema *tol-pal* portadoras del sistema de autólisis (*Pseudomonas putida* AXHL, *Pseudomonas putida* BXHL, *Pseudomonas putida* QXHL y *Pseudomonas putida* RXHL).**

Mediante conjugación triparental con la cepa CC118 $\lambda$ pir (pCNBHL) (Tabla 4) se introdujo el casete *ejh-ejl* en el genoma de la cepa *Pseudomonas putida* AX, generando la cepa *Pseudomonas putida* AXHL, siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el ejemplo 1.1. De forma similar, se construyó el resto de mutantes en el sistema Tol-pal portadores del sistema lítico: *Pseudomonas putida* BXHL, *Pseudomonas putida* QXHL y *Pseudomonas putida* RXHL (Tabla 3).

A continuación, se comprobó la capacidad de estos mutantes en el sistema Tol-pal portadores del sistema lítico (*Pseudomonas putida* AXHL, *Pseudomonas putida* BXHL, *Pseudomonas putida* QXHL y *Pseudomonas putida* RXHL) para crecer en medio de producción de PHA en dos fases fermentativas. Se observó que *Pseudomonas putida* BXHL era la única cepa capaz de alcanzar una densidad óptica similar a la de la cepa *Pseudomonas putida* KTHL, mientras que los demás mutantes no crecieron de manera óptima.

Para corroborar estos resultados, se cuantificó el contenido intracelular de PHA de las cepas descritas crecidas en dos fases fermentativas, siendo éste menor a 0.2 g/l en las cepas *Pseudomonas putida* AXHL, *Pseudomonas putida* RXHL y *Pseudomonas putida* QXHL. Sin embargo, el contenido de PHA de

*Pseudomonas putida* BXHL (0.88 g/l) es similar, e incluso mayor, al de la cepa *Pseudomonas putida* KTHL (0.78 g/l).

5 Teniendo en cuenta todos estos resultados, se seleccionó la cepa mutante en la proteína TolB portadora del sistema de autólisis, *Pseudomonas putida* BXHL.

### 2.3. Estudio de la expresión del sistema de autólisis celular en la cepa recombinante *Pseudomonas putida* BXHL.

10 Una vez comprobada la capacidad de la cepa mutante en la proteína TolB del sistema Tol-pal portadora del sistema lítico en monocopia (*Pseudomonas putida* BXHL) para crecer y producir PHA en un medio mínimo limitado en nitrógeno y con ácido octanoico como única fuente de carbono, se determinaron otros parámetros de fermentación concluyéndose que, en estas  
15 condiciones, la tasa de crecimiento de la cepa mutante fue inferior al índice de crecimiento de la cepa parental *Pseudomonas putida* KT2440. *Pseudomonas putida* BXHL solo fue capaz de crecer y acumular PHA de la misma manera que la cepa parental cuando el crecimiento se llevó a cabo en dos fases fermentativas.

20

La cuantificación del contenido intracelular de PHA de la cepa *Pseudomonas putida* BXHL en presencia y ausencia de 3-MB crecida en dos fases fermentativas en comparación con la cepa recombinante *Pseudomonas putida* KTHL, mostró que la producción de polímero es similar en ambas cepas. Los  
25 valores de contenido intracelular de PHA obtenidos para *Pseudomonas putida* KTHL en presencia y ausencia de 3-MB fueron 0.68 y 0.77 g/l, respectivamente. Los valores obtenidos para *Pseudomonas putida* BXHL en presencia y ausencia de 3-MB fueron 0.72 y 0.79 g/l, respectivamente.

30 La estimación de la viabilidad celular confirmó que, al igual que ocurría en las fermentaciones de *Pseudomonas putida* KTHL, cuando el inductor del sistema lítico (3-MB) está presente en el medio de cultivo se observa una inhibición en

el crecimiento de *Pseudomonas putida* BXHL, que no se observa en la cepa salvaje bajo las mismas condiciones (FIG. 3). Además, con esta cepa la ruptura celular observada es significativamente mayor que la obtenida con la cepa *Pseudomonas putida* KTHL.

5

Para llevar a cabo la cuantificación indirecta de la ruptura celular obtenida mediante el sistema lítico en *Pseudomonas putida* BXHL, se comparó el contenido en PHA presente en los sedimentos celulares resultantes de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa tras inducir la lisis celular. La

10 cuantificación del PHA presente en los sedimentos resultantes de la ultracentrifugación permite concluir que el porcentaje de ruptura obtenido tras la inducción del sistema lítico en la cepa *Pseudomonas putida* BXHL es significativamente menor que el obtenido con la prensa de French, donde la ruptura celular era prácticamente total (resultados no mostrados).

15

Con el objetivo de mejorar este rendimiento del sistema de lisis en la cepa *Pseudomonas putida* BXHL, una vez crecidas las células se incubaron con EDTA 10 mM y SDS 0,1%, y se sometieron a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa (FIG. 4). La muestra de *Pseudomonas putida* BXHL inducida con

20 3-MB (tubo 2) presenta una banda blanca de PHA en la interfase del gradiente significativamente mayor que la banda de la cepa la cepa parental *Pseudomonas putida* KT2440 bajo las mismas condiciones (tubo 1). La centrifugación en gradiente indica una lisis prácticamente total del cultivo, similar a la obtenida mediante la prensa de French.

25

Para corroborar estos resultados, se cuantificó el contenido intracelular de PHA de la cepa BXHL cultivada en presencia de 3-MB siendo del orden de 1,05 g/l. Cuando esta cepa se incubaba con 3-MB, EDTA y SDS, no se detecta PHA en la fracción intracelular (FIG. 5).

30

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Descripción de los microorganismos, plásmidos y cebadores empleados.

5

Las cepas de *Pseudomonas putida* y de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cepas empleadas.

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo/fenotipo relevante</b>	<b>Referencia</b>
<i>Escherichia coli</i> CC118 $\lambda$ pir	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> , $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> R <sup>f</sup> , Sp <sup>r</sup> , contiene el fago $\lambda$ pir	Herrero <i>et al.</i> , 1990. <i>J. Bacteriol</i> , 172: 6557-6567
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2 curada del plásmido TOL, <i>hsdR</i>	Nakazawa <i>et al.</i> , 2002. <i>Environ Microbiol.</i> 4: 782-786.
<i>Pseudomonas putida</i> KTHL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>Pseudomonas putida</i> AX	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolA::xylE</i> (con TolA acortado a 94 aminoácidos)	Llamas <i>et al.</i> 2000 <i>J. Bacteriol.</i> , 182: 4764-4772 (Llamas <i>et al.</i> 2000)
<i>Pseudomonas putida</i> BX	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolB::xylE</i> (con TolB acortado a 29 aminoácidos)	Llamas <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas putida</i> QX	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolQ::xylE</i> (con TolQ acortado a 17 aminoácidos)	Llamas <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas putida</i> RX	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolR::xylE</i> (con TolR deletado)	Llamas <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas putida</i> AXHL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolA::xylE</i> portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolB::xylE</i>	Este trabajo

<i>putida</i> BXHL	portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> , Km <sup>r</sup>	
<i>Pseudomonas putida</i> QXHL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolQ::xylE</i> portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>Pseudomonas putida</i> RXHL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 <i>tolR::xylE</i> portadora en cromosoma de los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo

**Tabla 4.** Plásmidos utilizados.

<b>Plásmido</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Referencia</b>
pNM185	pKT231, <i>xyIS/Pm</i> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Mermod <i>et al.</i> , 1986. <i>J. Bacteriol.</i> 167: 447-454
pEDF12	pNM185 con los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> del bacteriófago EJ-1	Díaz <i>et al.</i> , 1994. <i>Mol. Microbiol.</i> 13: 855-861
pCNB1	pUTmini-Tn5, <i>xyIS/Pm</i> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	De Lorenzo <i>et al.</i> , 1993. <i>Gene.</i> 130: 41-46
pUC18Not	Equivalente a pUC18 (Yanish-Perron <i>et al.</i> 1985) pero con el sitio de clonación múltiple flanqueado por sitios <i>NotI</i>	Herrero <i>et al.</i> , 1990. <i>J. Bacteriol.</i> 172: 6557-6567
pCNBHL	pCNB1 con los genes <i>ejh</i> y <i>ejl</i> del bacteriófago EJ-1	Este trabajo

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de productos por PCR. Las secuencias subrayadas se corresponden con las dianas de restricción creadas.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia(5' → 3')</b>
V 08	SEQ ID NO: 3; CTAGTCTAGAGGCCAACAACATTACCATAATAGAA
V 09	SEQ ID NO: 4; CGCGGATCCGTCTTTCTATTTTGTGCGTAATCAAGCCG

5

### 3.2. Medios y condiciones de cultivo empleados.

El medio rico utilizado para cultivar las células de *E. coli* y *Pseudomonas putida* fue el Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Rusell, 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). El medio mínimo utilizado para cultivar las células fue el medio denominado 0.1 N M63 (13,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 mg SO<sub>4</sub>Fe × 7 H<sub>2</sub>O por litro, pH 7) suplementado con 1 mM de MgSO<sub>4</sub> y una solución de elementos traza (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212). Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces en un agitador orbital (New brunswick scientific) a 200 rpm. Las células de *E. coli* y *Pseudomonas putida* se incubaron a 37°C y 30°C, respectivamente.

El crecimiento en medio líquido se determinó por turbidimetría a 600 nm (DO<sub>600</sub>) empleando un espectrofotómetro Beckman DU-520.

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4°C en placas de LB o medio mínimo. Para la conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80°C.

25

Para producir PHA se cultivaron las células de *Pseudomonas putida* KT2440 durante 24 h en medio M63 0,1 N cuya composición es similar a la del M63 pero con 0,2 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en lugar de 2 g/l, utilizando 15 mM de octanoato

como única fuente de carbono (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3205-3212).

### 3.3. Transformación genética de las células utilizadas.

5

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de RbCl (Sambrook y Rusell, 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.), o bien mediante electroporación (Wirth *et al.*, 1989 *Mol Gen Genet* 216: 175-177).

10

Las células de *Pseudomonas putida* se modificaron genéticamente por transformación por electroporación. Para electroporar las células de *Pseudomonas putida* se recogieron células en cultivo líquido o masa celular proveniente de placas de agar y se realizaron cinco lavados con agua estéril a 15 4°C. Las condiciones del equipo de electroporación *Gene Pulser/Pulse Controller* (Bio-Rad) fueron 2,5 kV, 25 µF y 200 Ω.

15

En algunas circunstancias los plásmidos se movilizaron a *Pseudomonas putida* por conjugación bi- o tri-parental siguiendo el método descrito por de Lorenzo y Timmis, (1994) *Methods Enzymol* 235: 386-405) y utilizando la cepa *E. coli* HB101 (pRK600) como cepa auxiliar. Los transconjugantes de *Pseudomonas putida* fueron seleccionados en placas de medio LB con los correspondientes antibióticos o en placas de medio mínimo con citrato al 0,2% y el correspondiente antibiótico.

20

25

### 3.4. Técnicas de manipulación de DNA utilizadas.

Las técnicas utilizadas para la preparación y manipulación del DNA han sido descritas por Sambrook y Rusell (2001). Las enzimas de restricción se obtuvieron de Amersham, Takara y *New England Biolabs*. La enzima T4 DNA ligasa fue proporcionada por USB (Amersham), la DNA polimerasa I de

30

*Thermus sp.* y la Pfu polimerasa fueron suministradas por Biotools B&M Labs. S. A. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron empleando geles de agarosa, mediante el kit *GeneClean* (BIO 101) o el *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

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

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

La amplificación del DNA se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* de Eppendorf. Las mezclas de reacción contenían  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, dimetilsulfóxido al 10%, 0,5 unidades de DNA polimerasa, 100 ng de DNA molde y oligonucleótidos a una concentración final de 0,5  $\mu M$ . Los fragmentos de DNA se purificaron empleando geles de agarosa, usando el kit *GeneClean* (BIO 101) o el kit "*High Pure™* PCR Product Purification Kit" (Boehringer Mannheim).

Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR fueron adquiridos en Sigma-Genosys y se indican en la Tabla 5.

### 3.5. Cuantificación de PHA.

Para cuantificar el PHA presente en los sedimentos celulares se tomaron de 5 a 10 mg de muestra liofilizada que se metanolizaron durante 4 h a 100°C en presencia de 2 ml de cloroformo y 2 ml de metanol:ácido sulfúrico (85:15, v:v) con 0,5 mg/ml de ácido metil benzoico como estándar interno. Tras enfriar los tubos, se añadió 1 ml de agua, se mezcló por agitación vigorosa (vórtex) y se

separaron las fases centrifugando suavemente. La fase orgánica obtenida se analizó en un sistema cromatográfico compuesto por un cromatógrafo de gases Agilent (Waldbronn, Alemania) serie 7890 A acoplado a un detector de masas 5975.

- 5 1  $\mu\text{l}$  de la fase orgánica fue inyectada en el cromatógrafo con un *split* 50:1. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar HP5 MS (5% fenil-95% metil siloxano, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 mm). Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 0,9 ml/min. Las temperaturas del inyector y la línea de transferencia fueron de 275 y 300°C, respectivamente. El programa
- 10 de temperatura de la columna fue el siguiente: temperatura inicial 80°C durante 2 min tras lo cual se aplicó una rampa de 10°C/min hasta alcanzar los 200°C. El espectro de masas se recogió en modo *full scan* (m/z 40-550). El análisis cuantitativo se llevó a cabo calculando los factores de respuesta de los monómeros con respecto al 3-MB. Para el cálculo de los factores se utilizaron
- 15 mezclas de concentraciones conocidas de PHA, obteniéndose para cada uno de los monómeros cuantificados un factor de respuesta cuyo coeficiente de variación no superó el 5%.

### 3.6. Determinación de la sensibilidad de las bacterias a aceleradores de

20 **lisis.**

- Para determinar la sensibilidad de las bacterias a dodecilsulfato sódico (SDS), desoxicolato (DOC) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se inocularon las cepas en medio LB a DO600 0,5. Tras 6 h de incubación en agitación orbital se añadieron distintas concentraciones de los agentes químicos anteriormente
- 25 mencionados durante 18 h. El crecimiento de estos cultivos se llevó a cabo en placas de 96 pocillos a 30°C con 2 min de agitación orbital fuerte cada 15 min (Multiskan Ascent, Thermo). Los valores de crecimiento que se muestran son la media de 3 replicados.

**REIVINDICACIONES**

1. Cepa recombinante bacteriana *Pseudomonas putida* KT2440, que comprende un sistema genético heterólogo lítico donde dicho sistema a su vez comprende las secuencias nucleotídicas que codifican:
  - a) una enzima lítica de pared celular,
  - b) una holina, y
  - c) un sistema regulador de la expresión génica
2. Cepa según la reivindicación 1, donde:
  - a) la enzima lítica de pared celular es la endolisina Ejl,
  - b) la holina es la proteína Ejh, y
  - c) el sistema regulador de la expresión génica es XylS/Pm
3. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7659.
4. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 es mutante en uno o más de los genes *tol-pal*.
5. Cepa según la reivindicación 4, donde dicha cepa es el microorganismo con número de depósito CECT 7658.
6. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el sistema genético heterólogo lítico está insertado en su ADN cromosómico.
7. Cepa según la reivindicación 6, donde el sistema genético heterólogo lítico insertado en su ADN cromosómico se encuentra en una sola copia.

8. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la extracción de polihidroxiálcanoato (PHA).
9. Método para la extracción de polihidroxiálcanoato (PHA) sintetizado por la bacteria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:
- a) cultivar dicha cepa en un medio mínimo de cultivo,
  - b) añadir un compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico al cultivo del paso (a), y
  - c) aislar el compuesto sintetizado por dicha bacteria.
10. Método según la reivindicación 9, donde además comprende un paso previo al paso (a) donde la cepa o población bacteriana se cultiva en un medio rico de cultivo.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, donde el compuesto efector de la expresión del sistema genético heterólogo lítico es ácido 3-metilbenzoico.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde además, tras el paso (b), se adiciona una sustancia química que produce lisis celular o que acelera la lisis celular mediada por el sistema genético heterólogo lítico.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde además, después del paso (a), se adiciona un precursor de PHA.
14. Método según la reivindicación 13, donde el precursor de PHA es un ácido graso o cualquier molécula susceptible de ser transformada en hidroxialcanoil-CoA mediante el metabolismo bacteriano.

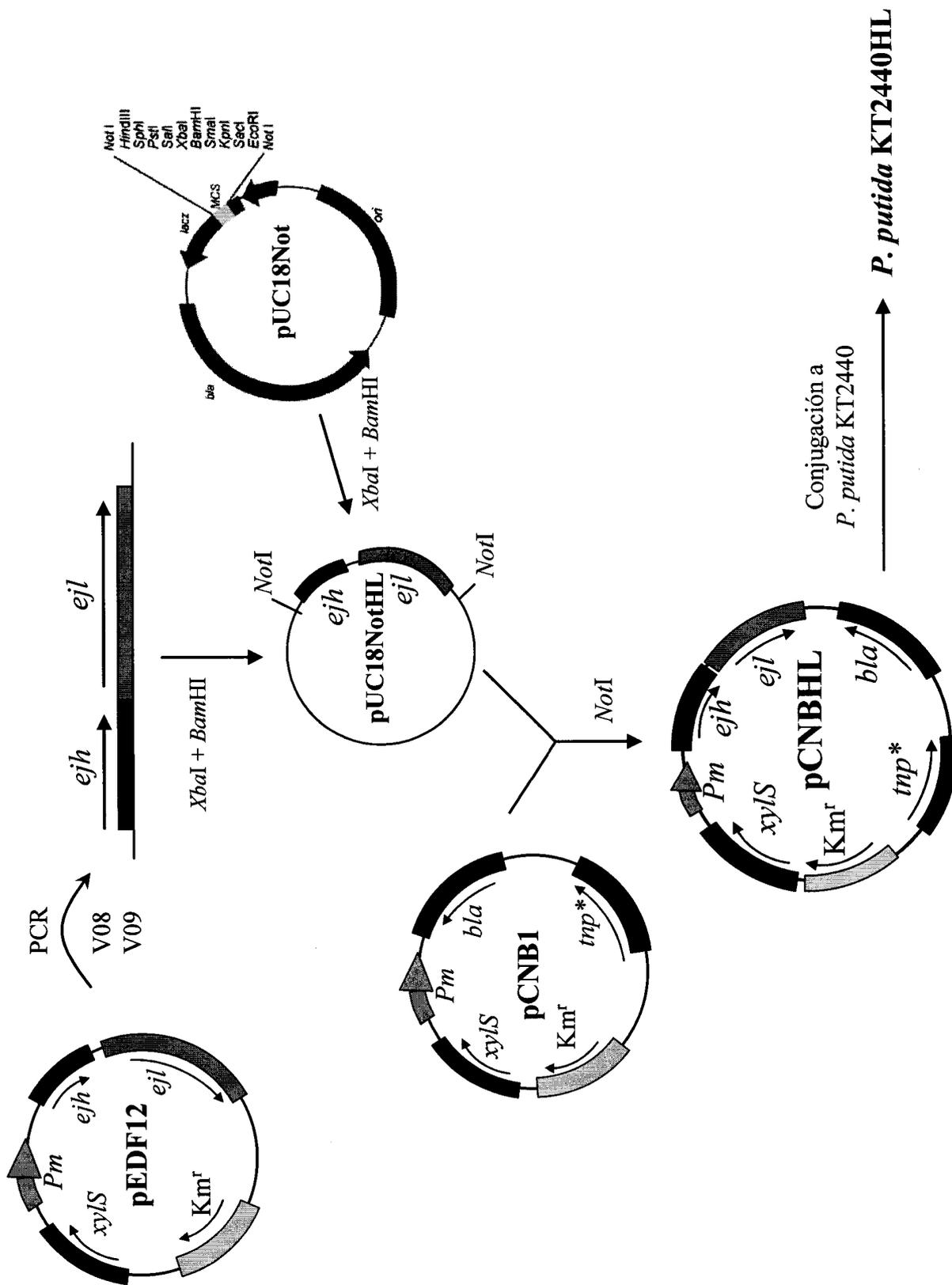


FIG. 1

2/3

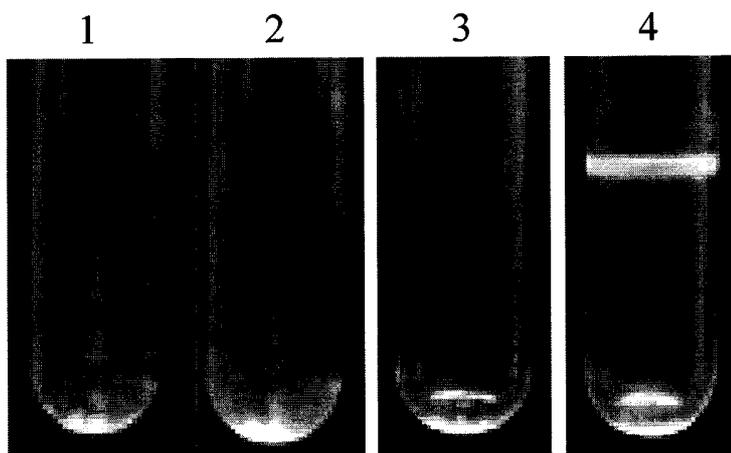


FIG. 2

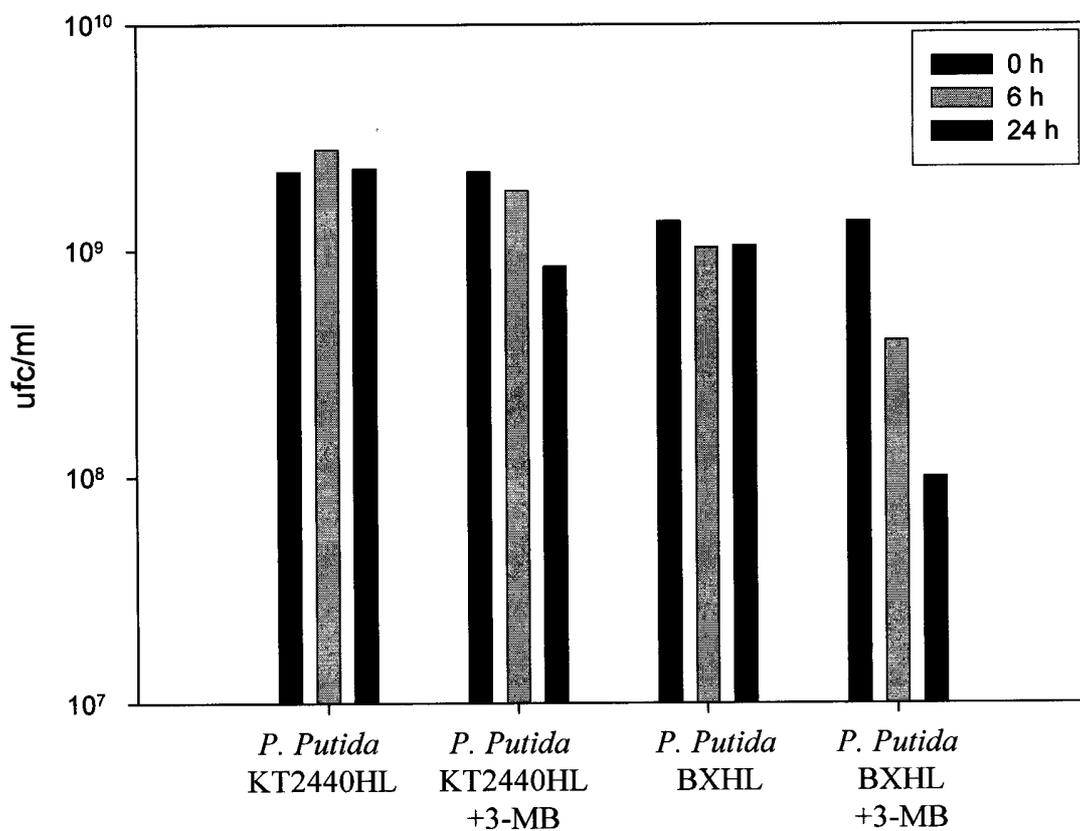


FIG. 3

3/3

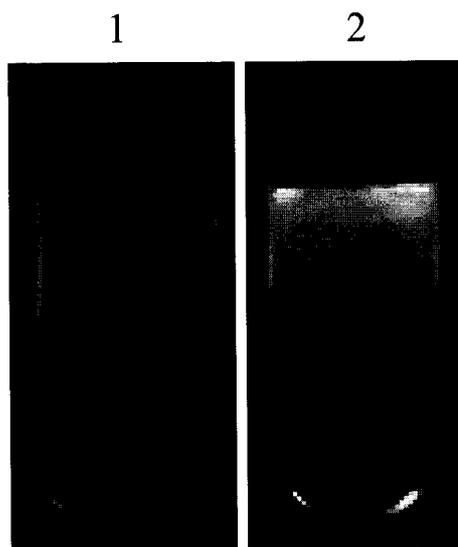


FIG. 4

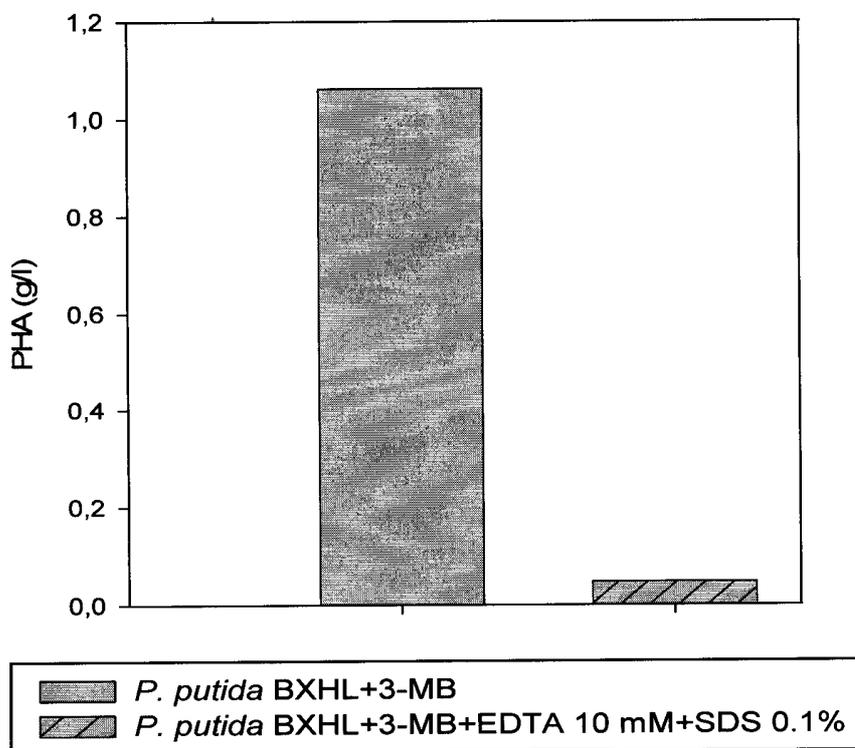


FIG. 5



**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070858

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>LLAMAS MARIA A ET AL: "Mutations in each of the Tol genes of Pseudomonas putida reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC; US, vol. 182. no. 17, 1 Sept 2000 (2000-09-01), paginas 4764-4772, XP002208246, ISSN: 0021-9193, DOI: DOI:10.1128/JB.182.17.4764-4772.2000</p> <p><b>Todo el documento</b></p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>YU HUIMIN ET AL: "Construction and selection of the novel recombinant Escherichia coli strain for poly(beta-hydroxybutyrate) production", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 89, no. 4, April 2000 (2000-04), pag 307-311, XP009149016, ISSN: 1389-1723</p> <p><b>resumen</b></p> <p>pag 307, column 1</p> <p>pag 310, column 2, <b>último paragrafo</b></p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>US 6 180 367 B1 (LEUNG WOON-LAM SUSAN [US] ET AL) 30 January 2001 (2001-01-30)</p> <p><b>resumen</b></p> <p>column 27, line 6 - column 28, <b>última linea</b></p> <p><b>reivindicaciones 1-12; fig 8</b></p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>ELBAHLOUL YASSER ET AL: "Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by Pseudomonas putida GPol and a simplified downstream process.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY FEB 2009 LNKD- PUBMED:19047387, vol. 75, no. 3, Febr 2009 (2009-02), paginas 643-651, XP002639897, ISSN: 1098-5336</p> <p><b>Todo el documento</b></p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>WANG ING-NANG ET AL: "Holins: The protein clocks of bacteriophage infections", ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY ANNUAL REVIEWS {A}, 4139 EL CAMINO WAY, PALO ALTO, CA, 94303-0139, USA SERIES : ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY (ISSN 0066-4227), 2000, paginas 799-825, XP002639898, pagina 814, paragr 2 - pagina 815, paragr 2</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070858

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X,P	<p>WO 2009/155357 A1 (UNIV ARIZONA [US]; CURTISS ROY III [US]; LIU XINYAO [US])                      23 Diciembre 2009 (2009-12-23)  <b>Todo el documento</b></p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
T	<p>MARTÍNEZ V ET AL.: "Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoate recovery in Pseudomonas putida KT2440", MICROBIAL BIOTECHNOLOGY, vol. 4, 21 Marzo 2011 (2011-03-21), XP009149011, DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00257.x  <b>Todo el documento</b></p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070858

US 6180367      B1      30-01-2001      US      6258560 B1      10-07-2001

-----  
WO 2009155357      A1      23-12-2009      Ninguno  
-----

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/ES2010/070858
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N1/06 C12P7/62 ADD.				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, IBM-TDB				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	DIAZ E ET AL: "THE TWO-STEP LYSIS SYSTEM OF PNEUMOCOCCAL BACTERIOPHAGE EJ-1 IS FUNCTIONAL IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA: TRIGGERING OF THE MAJOR PNEUMOCOCCAL AUTOLYSIN IN ESCHERICHIA COLI", MOLECULAR MICROBIOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 19, no. 4, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 667-681, XP000992658, ISSN: 0950-382X, DOI: DOI:10.1046/J.1365-2958.1996.399929.X abstract page 669, column 2, paragraph 2 - page 671, column 1, paragraph 1; figure 2 page 678, column 2, paragraph 2 ----- -/--	1,2,4, 6-14		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.</td> <td style="width: 50%; border: none;"><input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.			
* Special categories of cited documents :				
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report			
1 June 2011	22/06/2011			
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Dumont, Elisabeth			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2010/070858

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LLAMAS MARIA A ET AL: "Mutations in each of the Tol genes of Pseudomonas putida reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC; US, vol. 182, no. 17, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 4764-4772, XP002208246, ISSN: 0021-9193, DOI: DOI:10.1128/JB.182.17.4764-4772.2000 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
A	<p>YU HUIMIN ET AL: "Construction and selection of the novel recombinant Escherichia coli strain for poly(beta-hydroxybutyrate) production", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 89, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 307-311, XP009149016, ISSN: 1389-1723 abstract page 307, column 1 page 310, column 2, last paragraph</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
A	<p>US 6 180 367 B1 (LEUNG WOON-LAM SUSAN [US] ET AL) 30 January 2001 (2001-01-30) abstract column 27, line 6 - column 28, last line; claims 1-12; figure 8</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
A	<p>ELBAHLOUL YASSER ET AL: "Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by Pseudomonas putida GPol and a simplified downstream process.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY FEB 2009 LNKD- PUBMED:19047387, vol. 75, no. 3, February 2009 (2009-02), pages 643-651, XP002639897, ISSN: 1098-5336 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
A	<p>WANG ING-NANG ET AL: "Holins: The protein clocks of bacteriophage infections", ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY ANNUAL REVIEWS {A}, 4139 EL CAMINO WAY, PALO ALTO, CA, 94303-0139, USA SERIES : ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY (ISSN 0066-4227), 2000, pages 799-825, XP002639898, page 814, paragraph 2 - page 815, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2010/070858

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2009/155357 A1 (UNIV ARIZONA [US]; CURTISS ROY III [US]; LIU XINYAO [US]) 23 December 2009 (2009-12-23) the whole document	1-14
T	----- MARTÍNEZ V ET AL.: "Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoate recovery in Pseudomonas putida KT2440", MICROBIAL BIOTECHNOLOGY, vol. 4, 21 March 2011 (2011-03-21), XP009149011, DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00257.x the whole document -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2010/070858

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 6180367	B1	30-01-2001	US 6258560 B1	10-07-2001
-----				
WO 2009155357	A1	23-12-2009	NONE	
-----				