

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 179**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2008 E 08793214 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2201115**

54 Título: **Mutantes que tienen capacidad de producir 1,4-butanodiol y procedimiento para la preparación de 1,4-butanodiol utilizando los mismos**

30 Prioridad:

**07.09.2007 KR 20070091081**

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

**19.02.2013**

73 Titular/es:

**LG CHEM, LTD. (50.0%)  
20, YOIDO-DONG  
YOUNGDUNGPO-GU SEOUL 150-721, KR y  
KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE  
AND TECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PARK, SI JAE;  
LEE, SANG HYUN;  
LEE, SANG YUP y  
LEE, EUN JEONG**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 396 179 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Mutantes que tienen capacidad de producir 1,4-butanodiol y procedimiento para la preparación de 1,4-butanodiol utilizando los mismos

Sector técnico

5 La presente invención se refiere a un microorganismo mutante capaz de producir 1,4-butanodiol y un procedimiento para la preparación de 1,4-butanodiol utilizando el mismo.

Antecedentes técnicos

10 Se han sugerido los polímeros biodegradables como alternativa a los polímeros sintéticos, que son una de las causas principales de grave contaminación ambiental. Entre los varios polímeros biodegradables que están siendo desarrollados, el poli-β-hidroxi-butirato, un polímero biodegradable almacenado por varios microorganismos en estado de nutrición desequilibrada, tiene diferentes características como biodegradabilidad, resistencia al agua, piezoelectricidad y biocompatibilidad. En particular, el 4-hidroxi-butirato, que es un ejemplo de polihidroxi-alcanoato (PHA) tiene características parecidas a un poliéster y muestra un amplio rango de propiedades comprendidas desde las de un plástico cristalino a una goma altamente elástica. Por lo tanto, se están llevando a cabo en la actualidad importantes investigaciones sobre plásticos biodegradables por vía microbiana.

15 Además, el 4-hidroxi-butirato puede ser fácilmente convertido en diferentes productos químicos que tienen 4 átomos de carbono, tales como 1,4-butanodiol, γ-butirolactona (GBL) y THF. En particular, el 1,4-butanodiol es un importante producto químico industrial en diferentes formas, tales como polímero, disolvente e intermediario en química fina. Si bien la mayor parte de los productos químicos que tienen 4 átomos de carbono son sintetizados en la actualidad a partir de 1,4-butanodiol, anhídrido maleico y otros, los crecientes costes de producción provocados por el incremento de precio del petróleo requiere el desarrollo de otro proceso para compensar y sustituir el proceso convencional de producción química. Se ha sugerido como alternativa un proceso biológico.

20 Como es sabido, el succinato, ácido dicarboxílico con cuatro átomos de carbono, es un tipo de ácido orgánico producido cuando se cultiva un microorganismo en condiciones anaeróbicas. En la actualidad, se están utilizando varios microorganismos como células productoras de succinato y su coste de producción se ha reducido debido a un proceso efectivo de fermentación y al desarrollo de un proceso de separación y purificación. Asimismo, se puede producir 4-hidroxi-butirato a partir de succinato y varios ácidos orgánicos que tienen 4 átomos de carbono pueden ser derivados del 4-hidroxi-butirato.

25 La publicación PCT nº WO 2005/052135 es un ejemplo de solicitud de patente que da a conocer un procedimiento para la producción eficaz de succinato, en el que un mutante bacteriano de Rumen produce succinato en alta concentración sin producir otros ácidos orgánicos y un procedimiento de preparación de succinato utilizando el mutante. Además, se da a conocer un procedimiento para la preparación de un mutante de E. coli capaz de producir succinato en alta concentración en la solicitud de patente de Corea nº 10-2004-60149 y un procedimiento para la preparación de succinato utilizando un nuevo gen se da a conocer en las solicitudes de patentes de Corea nº 10-2005-0076301, nº 10-2005-0076317 y nº 10-2005-0076348.

30 Tal como se ha explicado en lo anterior, existe una elevada demanda de un mutante capaz de producir 1,4-butanodiol, importante producto químico industrial que tiene 4 átomos de carbono, así como un procedimiento para la preparación de 1,4-butanodiol.

Materia de la invención

35 Problema técnico

La presente invención está dirigida a dar a conocer un microorganismo mutante capaz de producir 1,4-butanodiol con elevada eficiencia, así como un procedimiento para la preparación de 1,4-butanodiol utilizando el mismo.

Solución técnica

40 En un aspecto, se introduce o amplifica un microorganismo capaz de producir succinato y preferentemente un mutante que muestra elevada producción de 1,4 butanodiol, en el que un gen que codifica una enzima que convierte succinato en 4-hidroxi-butirato y un gen que codifica una enzima que convierte 4-hidroxi-butirato en 1,4 butanodiol y se da a conocer un procedimiento para la preparación de 1,4 butanodiol utilizando los mismos, de acuerdo con las reivindicaciones independientes.

Se dan a conocer realizaciones preferentes en las reivindicaciones dependientes.

En otro aspecto, se da a conocer un gen butil-CoA dehidrogenasa de la SEQ ID NO: 8 ó 9, que produce de manera efectiva 1,4-butanodiol a partir de 4-hidroxibutil-CoA y un vector recombinante que presenta los mismos.

A continuación, se describirá la invención de manera más detallada.

5 Como resultado de los esfuerzos para preparar 1,4-butanodiol, utilizando un microorganismo capaz de producir succinato, los presentes inventores han desarrollado un microorganismo mutante que produce 1,4-butanodiol por inducción o amplificación de un gen asociado con la biosíntesis de 4-hidroxibutirato y/o un gen asociado con la biosíntesis de 1,4 butanodiol en el microorganismo capaz de producir succinato y han descubierto que el microorganismo mutante produce de manera efectiva 1,4-butanodiol. Este descubrimiento ha conducido a la presente invención.

10 El término "amplificación" que se utiliza en esta descripción significa un incremento en el nivel de expresión del gen en comparación con el nivel de expresión original. Si no hay gen que amplificar en un microorganismo antes de mutación, el como mínimo un gen puede ser introducido en el microorganismo y luego puede ser amplificado. Si existe un gen a amplificar en un microorganismo antes de la mutación, el como mínimo un gen puede ser introducido en el microorganismo por el mismo procedimiento descrito anteriormente o bien un gen originalmente presente en el microorganismo puede ser manipulado por una técnica de ingeniería genética para aumentar la expresión del gen. Por ejemplo, cuando una expresión de amplificación de un gen se encuentra presente en un microorganismo a mutar, un promotor original para la realización de la expresión del gen puede ser sustituido por un promotor más potente, amplificando de esta manera la expresión del gen.

15 El microorganismo capaz de producir succinato puede mostrar una elevada producción de succinato, siendo el microorganismo seleccionado del grupo que consiste en bacterias, por ejemplo, bacteria Rumen, *Corynebacterium species*, *Brevibacterium species* y *E. coli*.

La bacteria Rumen puede tener un gen en activo que codifica lactato dehidrogenasa (*ldhA*) y piruvato-formato liasa (*pfI*) y produce succinato en alta concentración sin otros ácidos orgánicos en condiciones anaeróbicas.

20 El término "inactivación" que se utiliza en esta descripción significa que un gen no es transcrito debido a mutación o que el ARNm transcrito no ha sido traducido apropiadamente en la proteína original. Para desactivar un gen, la mutación puede ser llevada a cabo prescindiendo de un gen o cambiando una secuencia de ácido nucleico de un gen.

25 Además, la bacteria Rumen puede tener genes inactivos que codifican lactato dehidrogenasa (*ldhA*), piruvato formato liasa (*pfI*), fosfotransacetilasa (*pta*) y acetato quinasa (*ackA*) y producen succinato en elevada concentración sin sustancial producción de otros ácidos orgánicos en condiciones anaeróbicas.

De manera alternativa, la bacteria Rumen puede tener genes inactivos que codifican lactato dehidrogenasa (*ldhA*), piruvato-formato liasa (*pfI*) y fosfopiruvato carboxilasa (*ppc*) y producen succinato en elevada concentración sin producción sustancial de otros ácidos orgánicos en situación anaeróbica.

30 La bacteria Rumen puede ser seleccionada a través del grupo que consiste en *Mannheimia sp.*, *Actinobacillus sp.* y *Anaerobiospirillum sp.*, pero la presente invención no está limitada a estos ejemplos. Es preferible *Mannheimia sp.* y *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP), *Mannheimia sp.* LPK (KCTC 10558BP), LPK4 y LPK7 (KCTC 10626BP) son más preferibles.

35 La *E. coli* puede tener genes inactivos que codifican glucosa fosfotransferasa (*ptsG*) y piruvato quinasa (*pykA* y *pykF*), y producen succinato en alta concentración sin producción sustancial de otros ácidos orgánicos en estado anaeróbico. En particular, el mutante de *E. coli* es preferentemente W3110GFA que se ha dado a conocer en la publicación de patente de Corea nº 10-2006-0011345.

40 Entre los microorganismos antes mencionados que producen succinato en alta concentración la bacteria Rumen puede ser preparada según un procedimiento que se da a conocer en la publicación PCT nº WO 2005/052135. Es decir, un gen de dehidrogenasa láctica (*ldhA*) y un gen de piruvato-formato de liasa (*pfI*) son inactivados en *Mannheimia succiniciproducens* 55E, construyendo de esta manera una cepa mutante, es decir, *Mannheimia sp.* LPK (KCTC 10558BP). Entonces, en las cepas de LPK se inactivan independientemente genes de fosfotransacetilasa (*pta*) y gen de acetato quinasa (*ackA*), así como un gen de fosfopiruvato carboxilasa (*ppc*), construyendo de esta manera cepas mutantes (*Mannheimia sp.* LPK7 y LPK4) que son cultivadas a continuación en condiciones anaeróbicas para producir succinato con alto rendimiento.

Además, entre los microorganismos que producen succinato en alta concentración se puede construir *E. coli* por un procedimiento que se da a conocer en la publicación de patente de Corea nº 10-2006-0011345. Es decir, la cepa mutante de *E. coli* W3110GFA es conseguida por inactivación de un gen que codifica glucosa fosfotransferasa (ptsG) y dos genes que codifican piruvato quinasa (*pykA* y *pykF*) en cepa W3110 transformada con un vector de expresión recombinante que expresa un bacteriófago operón rojo (exo-beta-gama). Entonces, cuando la cepa W3110GFA mutante de *E. coli* es cultivada en condiciones anaeróbicas, se puede confirmar que la productividad del mutante es superior a la cepa madre W3110.

Un gen de una enzima que convierte el succinato en 4-hidroxiacetil-CoA y un gen con una enzima asociada con la conversión del succinato semialdehído en succinato se puede derivar de *Clostridium kluyveri*, y un gen de una enzima que convierte el 4-hidroxiacetil-CoA en 1,4-butanodiol se puede derivar de *Clostridium acetobutylicum*. Si bien *Clostridium kluyveri* y *Clostridium acetobutylicum* no producen 4-hidroxiacetil-CoA y 1,4-butanodiol, las enzimas clonadas en estas cepas juegan un importante papel en la producción de 4-hidroxiacetil-CoA y 1,4-butanodiol.

Además, el gen de la enzima que convierte el succinato en 4-hidroxiacetil-CoA es seleccionado entre el grupo que consiste en un gen que codifica succinil-CoA transferasa (*Cat1*), un gen que codifica succinato semialdehído dehidrogenasa (*SucD*), un gen que codifica 4-hidroxiacetil-CoA dehidrogenasa (*hbD*) y un gen que codifica 4-hidroxiacetil-CoA dehidrogenasa (GHB). Preferentemente, el gen que codifica *Cat1* tiene una secuencia base de SEQ ID NO: 1, el gen que codifica *SucD* tiene una secuencia base de SEQ ID NO: 2, el gen que codifica *hbD* tiene una secuencia base de SEQ ID NO: 3, y el gen que codifica GHB tiene una secuencia base de SEQ ID NO: 4.

Por ejemplo, un microorganismo mutante de acuerdo con la presente invención puede tener un gen que codifica *Cat1*, un gen que codifica *SucD* y un gen que codifica *hbD*, o un gen que codifica *Cat1*, un gen que codifica *SucD* y un gen que codifica GHB, pero la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

Además, la utilización efectiva del succinato es muy importante para conseguir el objetivo de la presente invención y, por lo tanto, succinato dehidrogenasa (*GabD*) asociado con la conversión de succinato semialdehído en succinato se puede eliminar de *E. coli* recombinante de los microorganismos que producen succinato en elevada concentración. Por lo tanto, el microorganismo mutante, según la presente invención puede tener también un gen inactivo asociado con la conversión de succinato semialdehído en succinato, que es preferentemente un gen que codifica *GabD* succinato. El gen que codifica *GabD* tiene una secuencia base de SEQ ID NO: 10, pero la presente invención no está limitada a la secuencia

Asimismo, para transportar de manera efectiva succinato en un microorganismo, se puede amplificar la enzima de la proteína de transporte C4-dicarboxilato (*DctA*) asociada con el transporte de succinato. De este modo, el microorganismo mutante puede tener además un gen que codifica *DctA* asociado con el transporte de succinato, que es introducido en su interior o amplificado y un gen que codifica *DctA* tiene preferentemente una secuencia base de SEQ ID NO: 11.

Los genes de enzimas que convierten 4-hidroxiacetil-CoA en 1,4-butanodiol son genes que codifican 4-hidroxiacetil-CoA transferasa y alcohol dehidrogenasa reduciendo 4-hidroxiacetil-CoA o genes que codifican fosfotransbutirilasa butiril quinasa y alcohol dehidrogenasa reduciendo 4-hidroxiacetil-CoA.

El gen que codifica 4-hidroxiacetil-CoA transferasa puede tener una secuencia base de SEQ ID NO: 5, que puede ser sustituida por fosfotransbutirilasa (*ptb*; SEQ ID NO: 6) y butiril quinasa (*BuK*; SBQ ID NO: 7) para convertir 4-hidroxiacetil-CoA en 4-hidroxiacetil-CoA.

El alcohol dehidrogenasa puede ser butiril-CoA dehidrogenasa derivado de *Clostridium acetobutylicum*, y el gen que codifica butiril-CoA dehidrogenasa tiene preferentemente una secuencia base de SEQ. ID NO: 8 ó 9 (CAP0035 o CAP0162). Los genes de SEQ. ID. NO: 8 y 9 son muy útiles para producir 1,4-butanodiol en el microorganismo mutante según la presente invención. De acuerdo con ello, la presente invención proporciona un gen que codifica butiril-CoA dehidrogenasa y un vector recombinante que lo contiene.

El término "vector" significa un constructo de ADN que contiene una secuencia de ADN enlazada operativamente a una secuencia de control adecuada para expresar ADN en un huésped adecuado. En la presente invención, el vector puede comprender un vector plásmido, un vector bacteriófago, un vector cósmido, un vector de Levadura de Cromosoma Artificial (YAC) y preferentemente un vector plásmido. Por ejemplo, el vector plásmido puede comprender una constitución que comprende (a) un origen de replicación para replicación efectiva para tener varias copias en una célula huésped, (b) un gen de resistencia a antibióticos para seleccionar una célula huésped transformada con el vector plásmido y (c) un lugar de enzima de restricción en el que es capaz de ser insertado un fragmento de ADN extraño. Si bien no hay lugar de enzima de restricción adecuado, el vector puede ser ligado fácilmente con el ADN extraño utilizando un adaptador oligonucleótido sintético o un enlazador de acuerdo con un método convencional.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un microorganismo capaz de producir succinato y preferentemente un microorganismo mutante que muestra elevada producción de 1,4-butanodiol, en el que es inactivado un gen que codifica *GabD* y la totalidad de un gen que codifica *Cat1*, un gen que codifica *SucD*, un gen que codifica *4hbD* (o *GHB*), un gen que codifica 4-hidroxi-butil-CoA transferasa y un gen que codifica butil-CoA dehidrogenasa son introducidos o amplificados.

Además, la presente invención proporciona un microorganismo capaz de producir succinato y preferentemente un microorganismo mutante que muestra elevada producción de 1,4-butanodiol en el que un gen que codifica 4-hidroxi-butil-CoA (o un gen que codifica fosfobutililasa y un gen que codifica butiril quinasa) y un gen que codifica butil-CoA dehidrogenasa son introducidos o amplificados y un método de preparación de 1,4-butanodiol que utiliza el mismo.

La presente invención proporciona además un método para la preparación de 1,4-butanodiol que comprende el cultivo del mutante en un medio que contiene una fuente de carbono y obteniendo 1,4-butanodiol del cultivo.

#### Efectos ventajosos

Tal como se ha descrito en lo anterior, la presente invención proporciona un microorganismo capaz de producir succinato en elevada concentración, y más particularmente un mutante que muestra elevada producción de 1,4-butanodiol, que es un producto químico que tiene 4 átomos de carbono con un amplio rango de importantes aplicaciones en la química industrial y un método biológico para la preparación de 1,4-butanodiol que utiliza el mismo.

#### Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático de una ruta para la producción de 4-hidroxi-butilato a partir de succinato;

La figura 2 es un diagrama esquemático de una ruta para producir 1,4-butanodiol a través del 4-hidroxi-butilato producido a partir de succinato; y

La figura 3 muestra resultados de análisis GC de producción de 1,4-butanodiol.

#### Formas de la invención

A continuación, se describirá la presente invención en más detalle mediante ejemplos. Se comprenderá claramente por los técnicos en la materia que los ejemplos se facilitan solamente para explicar la presente invención, pero no para limitar su alcance.

Si bien en la presente invención el método de preparación de 1,4-butanodiol utiliza la bacteria Rumen, tal como los mutantes *Mannheimia sp.* LPK (KCTC 10558BP), LPK7 y LPK4, que tienen un gen inactivo derivado de la cepa *Mannheimia sp.* y produce succinato en elevada concentración, *E. coli* y el mutante *E. coli* W3110GFA, se comprenderá también de manera evidente por los técnicos en la materia que pueden producir 1,4-butanodiol al generar un mutante que produce succinato en elevada concentración utilizando otra cepa de bacteria Rumen, introduciendo y amplificado un gen asociado con la producción de 1,4-butanodiol.

Además, si bien los siguientes ejemplos proporcionan un medio y método de cultivo específicos, se comprenderá claramente por los técnicos en la materia, tal como se da a conocer en las literaturas (Lee y otros, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 26:63, 2003; Lee y otros, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58:663, 2002; Lee y otros, *Biotechnol. Lett.*, 25:111, 2003; Lee y otros, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54:23, 2000; y Lee y otros, *Biotechnol. Bioeng.*, 72:41, 2001), un medio utilizado en esta invención puede ser diferente de un hidrolizado, tal como suero de la leche o licor de maíz o se pueden utilizar varios métodos de cultivo, tales como cultivo por lotes de alimentación y cultivo continuo.

#### **Ejemplo 1:** método para la preparación de un microorganismo que muestra elevada producción de succinato

##### 1-1. Preparación de bacteria Rumen que tiene elevada producción de succinato

Un microorganismo, la bacteria Rumen, que muestra elevada producción de succinato, de acuerdo con la presente invención, fue preparado según el método que se da a conocer en la publicación PCT nº WO 2005/052135. Es decir, una cepa mutante *Mannheimia sp.* LPK (KCTC 10558BP) fue preparada utilizando un gen de lactato dehidrogenasa (*ldhA*) y un gen de piruvato-formato liasa (*pfl*) en *Mannheimia succiniciproducens* 55E, que es una de las especies de la bacteria Rumen y cepas de mutante (*Mannheimia sp.* LPK7 y LPK4) fueron preparadas por inactivación de un gen de fosfotransacetilasa (*pta*), un gen de acetato quinasa (*ackA*) y un gen de fosfopiruvato carboxilasa (*ppc*) en la cepa LPK.

1-2. Preparación de E. Coli que muestra elevada producción de succinato

5 Se preparó un microorganismo, E. coli, que muestra elevada producción de succinato, de acuerdo con la presente invención por el método que se da a conocer en la publicación de patente de Corea nº 10-2006-0011345. Es decir, una cepa mutante de E. coli W3110GFA fue producida por inactivación de un gen que codifica glucosa fototransferasa (*ptsG*) y dos genes que codifican piruvato quinasa (*pykA* y *pykF*) en una cepa W3110, que fue transformada con un lector de expresión recombinante pTrcEBG que expresa un bacteriófago operón rojo (exo-beta-gama).

**Ejemplo 2:** Clonado de la enzima de conversión de 1,4-Butanodiol

2-1. Clonación de genes que codifican las enzimas de conversión de 4-Hidroxibutirato (Cat1, SucD y 4hbD)

10 Los presentes inventores amplificaron los genes *Cat1*, *sucD* y *4hbD* por reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores oligonucleótidos sintetizados basados en una secuencia de gen (L21902) conocida a efectos de clonar operones para genes que codifican *Cat1*, *SucD* y *4hbD* derivados de *Clostridium kluyveri* DSM 555. Los cebadores utilizados para PCR fueron los siguientes.

SEQ ID NO 12: Cat1f-SacI

15 5'-tttcccagctc TGTGAGGCGATTAAATGAGTAAAGGGATAAAG

SEQ ID NO 13: 4hbDb-XbaI

gc tctaga tta gat aaa aaa gag gac att tca caa tat gg

20 Para construir el vector de expresión pTacLac4HB1, se insertó el operón para los genes amplificados *cat1*, *sucD* y *4hbD* en el vector de expresión pTacLacl, que fue escindido con SacII/XbaI. El vector pTacLacl fue construido por fraccionamiento del vector pTac99A (Park y Lee, J. Bacteriol. 185, 5391-5397, 2003) con *SspI*, y ligando el vector escindido con pTrc991 (Amersham Pharmacia Biotech), que fue escindido también con *SspI*. El vector pTacLacl tiene la misma secuencia que pTrc99A, y pierde un lugar de reconocimiento de enzima de restricción *NcoI* (lugar de restricción) presente en el pTrc99A de los lugares de multiclonado (MCS). En este caso, MCS empezó con un lugar EcoRI.

25 2-2. Clonado de un gen que codifica DctA asociado con el transporte de succinato

Para clonar un gen que codifica DctA asociado con el transporte de succinato en E. coli W3110, se amplificó un gen DctA por ADN-PCR utilizando cebadores oligonucleótidos sintetizados basándose en una secuencia de genes conocida (NC\_000913). Los cebadores utilizados para PCR fueron los siguientes.

SEQ ID NO 14: DctAf-EcoRI

30 ggaattc ATGAAAACCTCTCTGTTTAAAAGC

SEQ ID NO 15: DctAb-XbaI

gc tctaga tta aga gga taa ttc gtg cgt ttt gcc

Para construir el vector de expresión p10499DctA, se fraccionó el gen amplificado *DctA* con *EcoRI/XbaI* y a continuación se insertó en el vector de expresión p10499A (Park y otros (2002) FEMS Microbiol. Lett 214:217-222).

35 2-3. Clonado del gen que codifica la enzima de conversión de 4-Hidroxibutirato en 1,4-Butanodiol

Para clonar genes que codifican butil-CoA dehidrogenasa de SEQ ID NOs: 8 y 9, que son enzimas que convierten ácido butírico en butanol en *Clostridium acetobutylicum*, se amplificaron genes *cap0035* y *cap0162* por ADN-PCR utilizando cebadores oligonucleótidos sintetizados basados en una secuencia de genes conocida (NC\_003030). Los cebadores utilizados para PCR fueron los siguientes.

40 SEQ ID NO: 16: CAP0035f-SacI

tttcccagctc atgaaagttacaaatcaaaaa

SEQ ID NO: 17: CAP0035b-XbaI

gc tctaga tta aaa tgc ttt tat ata gat

SEQ ID NO: 18: CAP0162f-EcoRI

GGAATTC atgaaagtcacaacagtaaag

5 SEQ ID NO: 19: CAP0162b-XbaI

gc tctaga tta agg ttg ttt ttt aaa

Para construir vectores de expresión pTacLacCAP35 y pTacLacCAP162, se insertaron los genes amplificados *cap0035* y *cap0162*, independientemente en vectores de expresión pTacLacI, que fueron escindidos con *SacI/XbaI* y *EcoRI/XbaI*.

10 Para convertir 4-hidroxiacetil-CoA en 4-hidroxiacetil-CoA, se amplificó por ADN-PCR un operón del gen *Cat2* de SEQ ID NO: 5 utilizando cebadores oligonucleótidos sintetizados basados en la secuencia de SEQ ID NO: 5. Los cebadores para PCR fueron los siguientes.

SEQ ID NO: 20: cat2f-EcoRI

ggaattcATGGAGTGGGAAGAGATATATAAAGAG

15 SEQ ID NO: 21: cat2b-BamHI

cg ggatcc tta aaa tct ctt ttt aaa ttc att cat taa tg

Para construir el vector de expresión pTacLacCat2, el gen *cat2* amplificado fue insertado en el vector de expresión pTacLacI, que fue escindido con *EcoRI/BamHI*.

20 Para convertir 4-hidroxiacetil-CoA en 4-hidroxiacetil-CoA, se amplificaron por ADN-PCR operones para genes *ptb* y *buk* de SEQ ID NOs: 6 y 7 utilizando cebadores oligonucleótidos sintetizados basándose en las secuencias de SEQ ID NOs: 6 y 7. Los cebadores utilizados para PCR fueron los siguientes.

SEQ ID NO: 22: ptbf-RcoRI

ggaattc ATGATTAAGAGTITTAATGAAATATCATG

SEQ IDNO: 23: bukb-XbaI

25 gc tctaga tta ttt gta ttc ctt agc ttt ttc ttc tcc

Para construir un vector de expresión se insertaron en el vector de expresión pTacLacI, operones para los genes amplificados *ptb* y *buk*, siendo escindido el vector con *EcoRI/XbaI*, obteniendo de esta manera pTacLacPtbBuk. El vector pTacLacPtbBuk fue escindido con *SspI* para obtener un fragmento de gen incluyendo un promotor tac, los genes *ptb* y *buk* y un terminador de transcripción y el fragmento de gen fue insertado en el vector pBBR1MCS2 (Kovach y otros, Gene. 166:175, 1995) que fue escindido con *EcoRV*, obteniendo de esta manera el vector pMCS2TacPtbBuk.

30

### Ejemplo 3: Producción de 1,4-BDO

Los vectores pTacCAP162 y pMCS2Tactptbbuk fueron transformados simultáneamente con *E. coli* XLI-Azul por electroporación y a continuación aplicado sobre una placa LB conteniendo 100 ug/ml de ampicilina y 50 ug/ml de quinamicina y se cultivaron durante una noche a 37°C. La colonia cultivada fue inoculada en un tubo de 15ml (Falcon, USA) que tenía 3 ml de medio líquido LB conteniendo 100 ug/ml de ampicilina y fue cultivado en un inculador con agitación en una noche a 200rpm y 37°C. Las células incubadas fueron inoculadas en un medio líquido reciente LB conteniendo 100 ml de glucosa al 2% y 100 ug/ml de ampicilina y a continuación se cultivó en un incubador con agitación a 200 rpm y 37°C. Cuando OD<sub>600</sub> alcanzó 0,7, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir expresión de proteína y las células fueron cultivadas durante una noche.

35

40

## ES 2 396 179 T3

Después de ello, el cultivo fue centrifugado y el sobrenadante fue retirado del mismo. A continuación, la pastilla de células fue lavada con medio MR una vez, se resuspendió en un medio MR conteniendo 50 ml de glucosa al 2% y gama-butirolactona al 2% y 1 nM de IPTG, y se evaporó utilizando una mezcla de gas de H<sub>2</sub> al 5%, CO<sub>2</sub> al 5% y resto N<sub>2</sub> durante 30 minutos para conseguir condiciones anaeróbicas. El cultivo fue desarrollado en un incubador con agitación a lo largo de la noche durante 3 días a 200 rpm y 37°C, y a continuación se centrifugó obteniendo un sobrenadante. El sobrenadante obtenido fue concentrado dos veces y utilizado como muestra de análisis GC para análisis para confirmar la producción de 1,4-butanodiol. El análisis fue llevado a cabo en las siguientes condiciones y los resultados se muestran en la figura 3.

Columna: AT-Cera (0,53 mm ID x 15 ml, 1,2 um u.f. capilar)

10 Velocidad caudal de gas: Columna (He): 4,0 ml/min

Temperatura estufa: valor inicial & tiempo: 50°C, 5 min

Velocidad programada: 10°C/min

Valor final & tiempo: 250°C, 5 min

Temperatura del inyector: 250°C

15 Temperatura del detector: 250°C

Proporción división inyector: 20/1

Volumen inyector: 1,0 ul

Tal como se muestra en la figura 3, se confirmó que se había producido 1,4-butanodiol.

<110> LG CHEM, LTD.

20 Korea Advanced Institute of Science and Technology

<120> Mutantes que tienen capacidad de producir 1,4-butanodiol y procedimiento para la preparación de 1,4-butanodiol utilizando los mismos

<130> F2008-0085PC (X08029)

<150> KR10-2007-0091081

25 <151>2007-09-07

<160>23

<170> Kopatentin 1.71

<210>1

<211>1617

30 <212> ADN

<213> gen que codifica Cat1

<400> 1

ES 2 396 179 T3

atgagtaaag ggataaagaa ttcacaattg aaaaaaaga atgtaaaggc tagtaatgtg 60  
 gcagaaaaga ttgaagagaa agttgaaaa acagataagg ttggtgaaaa ggcagctgag 120  
 gttactgaaa aacgaattag aaacttgaag cttcaggaaa aagttgtaac agcagatgtg 180  
 gcagctgata tgatagaaaa cggtagatt gttgcaatta gcggatttac tccttccggg 240  
 ttcctaaag aagtaccta agcattgact aaaaaagtta atgccttaga ggaagaattc 300  
 aaggtaacac tttatacagg ttcattctaca ggagccgata tagacggaga atgggcaaaa 360  
 gcaggaataa tagaagaag aattccatat cagacaaatt ctgatatgag gaaaaaata 420  
 aatgatggtt ctattaagta tgctgatatg catttaagcc atatggctca atatattaat 480  
 tattctgtaa ttcctaaagt agatatagct ataatagagg cagtagctat tacagaagaa 540  
 ggggatatta ttccttcaac aggaattgga aatacagcta cttttgtgga aatgcagat 600  
 aaggtaatag tggaaattaa tgaggctcaa ccgcttgaat tggaaaggtat ggcagatata 660  
 tatacattaa aaaaccctcc aagaagagag cccataccta tagttaatgc aggcaatagg 720  
 ataggacca catatgtgac ctgtggttct gaaaaaatat gcgctatagt gatgacaaat 780  
 acccaggata aaacaagacc tcttacagaa gtgtctctctg tatctcaggc tatatccgat 840  
 aatcttatag gatttttaaa taaagagggt gaagagggaa aattaccta gaacctgctt 900  
 cctatacagt caggagttgg aagtgtagca aatgcagttt tggccggact ttgtgaatca 960  
 aattttaaaa atttgagttg ttatacagaa gttatacagg attctatgct gaagcttata 1020  
 aatgtggta aagcagatgt ggtgtcaggc acttcataa gtccttcacc ggagatgttg 1080  
 cctgagttca taaaggacat aaatttcttt agagaaaaga tagtattaag accacaggaa 1140  
 ataagtaata atccagagat agcaagaaga ataggagtta tatccataaa cactgctttg 1200  
 gaagtagata tatatggtaa tgtaaactcc actcatgtta tgggaagcaa aatgatgaat 1260  
 ggtataggcg gttctggaga ctttgccaga aatgcatatt tgactatatt cactacagag 1320  
 tctatcgcca aaaaaggaga tatatcatct atagttccta tggtatccca tgtggatcat 1380  
 acagaacatg atgtaatggt aattgttaca gaacaggag tagcagattt aagaggcttt 1440  
 tctcctaggg aaaaggcctg ggctataata gaaaattgtg ttcctcctga ttacaaggat 1500  
 atgcttatgg aatattttga agaggcttgt aagtcctcag gtggaaatac accacataat 1560  
 cttgaaaaag ctcttctctg gcatacaaaa tttataaaaa ctggtagtat gaaataa 1617

<210> 2

<211> 1419

5 <212> ADN

ES 2 396 179 T3

<213> gen que codifica SucD

<400> 2

atgagtaatg aagtatctat aaaagaatta attgaaaagg caaaggcggc acaaaaaaaaa	60
ttggaagcct atagtcaaga acaagttgat gtactagtaa aagcactagg aaaagtggtt	120
tatgataatg cagaaatggt tgcaaaagaa gcagttgaag aaacagaaat ggggtgtttat	180
gaagataaag tagctaaatg tcatttgaaa tcaggagcta tttggaatca tataaaagac	240
aagaaaactg taggcataat aaaagaagaa cctgaaaggg cacttgttta tgttgctaag	300
ccaaagggag ttgtggcagc tactacgcct ataactaatc cagtggtaac tcctatgtgt	360
aatgcaatgg ctgctataaa gggcagaaat acaataatag tagcaccaca tcctaaagca	420
aagaaagttt cagctcatac tgtagaactt atgaatgctg agcttaaaaa attgggagca	480
ccagaaaata tcatacagat agtagaagca ccatcaagag aagctgctaa ggaacttatg	540
gaaagtgctg atgtagtatt tgctacaggc ggtgctggaa gagttaaagc tgcttactcc	600
agtggaagac cagcttatgg cgttggacct ggaaattcac aggtaatagt tgataagggg	660
tacgattata acaaagctgc acaggatata ataacaggaa gaaaatatga caatggaatt	720
atatgttctt cagagcaatc agttatagct cctgctgaag attatgataa ggtaatagca	780
gctttttagt aaaatggggc attctatgta gaagatgagg aaacagtaga aaagtttaga	840
tcaactttat ttaaagatgg aaaaataaac agcaagatta taggtaaate cgtccaaatt	900
attgcggatc ttgcaggagt aaaagtacca gaaggtacta aggttatagt acttaagggt	960
aaaggtgcag gagaaaaaga tgtactttgt aaagaaaaaa tgtgtccagt tttagtagca	1020
ttgaaatatg atacttttga agaagcagtt gaaatagcta tggctaatta tatgtatgaa	1080
ggagctggtc atacagcagg catacattct gacaatgacg agaacataag atatgcaaga	1140
actgtattac ctataagcag attagttgta aatcagcctg caactactgc tggaggaact	1200
gtattaccta taagcagatt agttgtaaat cagcctgcaa ctactgctgg aggaagtttc	1260
aataatggat ttaaccctac tactacacta ggctgcggat catggggcag aacagattt	1320
tcagaaaatc ttacttacga gcatcttata aatgtttcaa gaatagggta tttcaataaa	1380
gaagcaaaag ttccctagcta tgaggaaata tggggataa	1419

5 <210> 3

<211> 1116

<212> ADN

<213> gen que codifica 4hbD

ES 2 396 179 T3

<400> 3

atgaagttat taaaattggc acctgatggt tataaatttg atactgcaga ggagtttatg	60
aaatacttta aggttgaaa aggtgacttt atacttacta atgaattttt atataaacct	120
ttccttgaga aattcaatga tggatgcagat gctgtatttc aggagaaata tggactcggg	180
gaaccttctg atgaaatgat aaacaatata attaaggata ttggagataa acaatataat	240
agaattattg ctgtaggggg aggatctgta atagatatag ccaaaatcct cagtcttaag	300
tatactgatg attcattgga tttgtttgag ggaaaagtac ctcttgtaa aaacaaagaa	360
ttaattatag ttccaactac atgtggaaca gggtcagaag ttacaaatgt atcagttgca	420
gaattaaaga gaagacatac taaaaaagga attgcttcag acgaattata tgcaacttat	480
gcagtacttg taccagaatt tataaaagga cttccatata agttttttgt aaccagctcc	540
gtagatgcct taatacatgc aacagaagct tatgtatctc caaatgcaa tccttatact	600
gatatgttta gtgtaaaagc tatggagtta attttaaag gatacatgca aatggtagag	660
aaaggaaatg attacagagt tgaataaatt gaggattttg ttataggcag caattatgca	720
ggtatagctt ttggaaatgc aggagtggga gcggttcacg cactctcata tccaataggc	780
ggaaattatc atgtgcctca tggagaagca aattatctgt tttttacaga aatatttaaa	840
acttattatg agaaaaatcc aaatggcaag attaaagatg taaataaact attagcaggc	900
atactaaaat gtgatgaaag tgaagcttat gacagtttat cacaactttt agataaatta	960
ttgtcaagaa aaccattaag agaatatgga atgaaagagg aagaaattga aacttttgct	1020
gattcagtaa tagaaggaca gcagagactg ttggtaaaca attatgaacc tttttcaaga	1080
gaagacatag taaacacata taaaaagtta tatta	1116

<210> 4

<211> 1460

5 <212> ADN

<213> gen que codifica GHB

<400> 4

gaattgtgaa cgatcgctcg attttagtat gatgccagat gttccagtg cccggcagta	60
------------------------------------------------------------------	----

ES 2 396 179 T3

cgagataacc cggaaaagtc gctgtcagcc tgccacgcgg caagtttttg cgcgatgac 120  
 ggctgaagcg gtcccgaggg ctccggaac gcagtagtgc aggtccattg aaaccaaga 180  
 cagcgggcct ggcgagcatc egctccagge ccgtgcaaaa gacaatttgg cggcagatcc 240  
 cggcaggaga caagcaaca tggcgtttat ctactatctg acccacatcc acctggattt 300  
 cggcgcggta agcctgctca agtccgaatg cgagcgcac gccatccgcc gcccgttgct 360  
 ggtgaccgac aagggcgtgg tcgccgcggg agtggcgcag cgtgccatcg atgcaatgca 420  
 gggcctgcag gttgcggtat tcgatgaaac cccgtcgaac ccgaccgagg ccatggtgcg 480  
 caaggccgcc gcacaatacc gcgaggccgg ctgcgacggg ctggtggcag tgggcggcgg 540  
 ctcgtcgac gacctcgcca agggcatcgc catcctggcc acgcatgagg gcgagctgac 600  
 cacctatgcc accatcgaag gcggcagcgc caggatcacc gacaaggcgg cgcgctgat 660  
 cgcggtgccc accacctcgg gcaccggcag cgaggtggcg cgcggcgcca tcatcatcct 720  
 ggacgacggc cgcaagctgg gttccattc ctggcatttg ctgcccaagt ccgccgtctg 780  
 cgacccggaa ctgacgctgg ggctgccggc cgggctgacc gcggccaccg gcatggatgc 840  
 gatcgcgcac tgcacgaga cttcctggc cccgccttc aaccgcccg cggacggcat 900  
 tgcgctggac gggctggagc gcggctgggg ccatatcgaa cgcgccacc gcgacggtca 960  
 ggaccgcgac gcacgcctga acatgatgag cgcgtcgatg cagggcgcaa tggcgttcca 1020  
 gaaggggctg ggctgctgc attcgtctgc gcacccgctg ggcgggctga agatcgacgg 1080  
 ccgcaccggc ctgcaccacg gcaagctcaa cgcgggtggtg atgccggcgg tgcctgcctt 1140  
 caacgccgat gcgccacgg tggcgcgca cgaccgctac gcaagcctgc gccgcgcat 1200  
 gcacctgccc gacggcgccg atatcgcgca ggccgtgcac gacatgaccg tgcgctggg 1260  
 cctgcccacc gggctgcgtc agatgggtgt caccgaggac atgttcgaca aggtgattgc 1320  
 cggcgcgctg gtcgaccatt gccacaagac caaccgaaa gaagccagcg ccgcggatta 1380  
 tcggcgtatg cttgagcagt ccatgtagca cacagcggct tcccgccggt cagaccgacc 1440  
 aagcggctgt ccggcgccc 1460

<210> 5

<211> 1290

<212> ADN

5 <213> gen que codifica 4HB-CoA transferasa

<400> 5

ES 2 396 179 T3

atggagtg<sup>g</sup>g<sup>g</sup> aagagatata taaagagaaa ctggtaactg cagaaaaagc tgtttcaaaa 60  
atagaaaacc atagcagggt agtttttgca catgcagtag gagaaccctg agatttagta 120  
aatgcactag ttaaaaataa ggataattat ataggactag aaatagttca catggtagct 180  
atgggcaaag gtgtatatac aaaagagggt atgcaaagac attttagaca taatgctttg 240  
ttttaggcg gatctactag agatgcagta aattcaggaa gagcagttta tacaccttgt 300  
tttttctatg aagtccaag tttgtttaa gaaaaacgtt tgctgtaga tgtagcactt 360  
attcaggtaa gtgagccaga taaatatggc tactgcagtt ttggagtttc caatgactat 420  
accaagccag cagcagaaag tgctaagctt gtaattgcag aagtgaataa aaacatgcc 480  
agaactcttg gagattcttt tatacatgta tcagatattg attatatagt ggaagcttca 540  
caccattgt tagaattgca gcctcctaaa ttgggagatg tagaaaaagc cataggagaa 600  
aactgtgcat cttaattga agatggagct actcttcagc ttggaatagg tgctatacca 660  
gatgcggtac ttttattctt aaagaacaaa aagaatttag gaatacattc tgagatgata 720  
tcagatggtg tgatggaact ggtgaaggca ggggttatca ataacaagaa aaagaccctc 780  
catccaggca aaatagttgt aacattttta atgggaacaa aaaaattata tgattttgta 840  
aacaataatc caatggtaga aacttattct gtagattatg taaataatcc actggtaatt 900  
atgaaaaatg acaatatggt ttcaataaat tcttggttc aagtagactt aatgggacaa 960  
gtatgttctg aaagtatagg attgaaacag ataagtggag tgggaggcca ggtagatttt 1020  
attagaygag ctaatctatc aaagggtgga aaggctatta tagctatacc ttccacagct 1080  
ggaaaaggaa aagtttcaag aataactcca cttctagata ctggtgctgc agttacaact 1140  
tctagaaatg aagtagatta tgtagttact gaatatggtg ttgctcatct taagggcaaa 1200  
actttaagaa atagggcaag agctctaata aatatcgctc atccaaaatt cagagaatca 1260  
ttaatgaatg aatttaaaaa gagattttag 1290

<210> 6

<211> 906

5 <212> ADN

<213> gen que codifica Ptb

<400> 6

ES 2 396 179 T3

gtgattaaga gttttaatga aattatcatg aaggtaaaga gcaaagaaat gaaaaaagtt	60
gctgttgctg tagcacaaga cgagccagta cttgaagcag taagagatgc taagaaaaat	120
ggtattgcag atgctattct tgttggagac catgacgaaa tcgtgtcaat cgcgcttaa	180
ataggaatgg atgtaaata ttttgaata gtaaacgagc ctaacgtaa gaaagctgct	240
ttaaaggcag tagagcttgt atcaactgga aaagctgata tggtaatgaa gggacttga	300
aatacagcaa ctttcttaag atctgtatta aacaaagaag ttggacttag aacaggaaaa	360
actatgtctc acgttgcagt atttgaaact gagaaatttg atagactatt atttttaaca	420
gatgttgctt tcaataacta tcttgaatta aaggaaaaaa ttgatatagt aaacaattca	480
gtaaggttg cacatgcaat aggaattgaa aatccaaagg ttgctccaat ttgtgcagtt	540
gaggttataa accctaaaat gccatcaaca cttgatgcag caatgcttc aaaaatgagt	600
gacagaggac aaattaaagg ttgtgtagtt gacggacctt tagcacttga tatagcttta	660
tcagaagaag cagcacatca taaggagta acaggagaag ttgctggaaa agctgatatc	720
ttcttaatgc caaacataga aacaggaaat gtaatgtata agactttaac atatacaact	780
gattcaaaaa atggaggaat cttagttgga acttctgcac cagttgtttt aacttcaaga	840
gctgacagcc atgaaacaaa aatgaactct atagcacttg cagctttagt tgcaggcaat	900
aaataa	906

<210> 7

<211> 1068

5 <212> ADN

<213> gen que codifica Buk

<400> 7

ES 2 396 179 T3

atgtatagat tactaataat caatcctggc tcgacctcaa ctaaaattgg tatttatgac	60
gatgaaaaag agatatttga gaagacttta agacattcag ctgaagagat agaaaaatat	120
aacactatat ttgatcaatt tcaattcaga aagaatgtaa ttttagatgc gttaaaagaa	180
gcaaacatag aagtaagttc tttaaatgct gtagttggaa gaggcggact cttaaagcca	240
atagtaagtg gaacttatgc agtaaataca aaaatgcttg aagaccttaa agtaggagtt	300
caaggtcagc atgcgtcaaa tcttgggtga attattgcaa atgaaatagc aaaagaaata	360
aatgttccag catacatagt tgatccagtt gttgtggatg agcttgatga agtttcaaga	420
atatcaggaa tggctgacat tccaagaaaa agtatattcc atgcattaaa tcaaaaagca	480
gttgctagaa gatatgcaaa agaagttgga aaaaaatagc aagatcttaa ttaaatcgta	540
gtccacatgg gtggaggtagc ttcagtaggt actcataaag atggtagagt aatagaagtt	600
aataatacac ttgatggaga aggtccattc tcaccagaaa gaagtggtagg agttccaata	660
ggagatcttg taagattgtg cttcagcaac aaatatactt atgaagaagt aatgaaaaag	720
ataaacggca aaggcggagt tgtagttac ttaaatacta tcgattttaa ggctgtagtt	780
gataaagctc ttgaaggaga taagaaatgt gcacttatat atgaagcttt cacattccag	840
gtagcaaaag agataggaaa atgttcaacc gttttaaaag gaaatgtaga tgcaataatc	900
ttaacaggcg gaattgcgta caacgagcat gtatgtaatg ccatagagga tagagtaaaa	960
ttcatagcac ctgtagttag atatggtgga gaagatgaac ttcttgactc tgcaagaagg	1020
ggacttagag ttttaagagg agaagaaaaa gctaaggaat acaataa	1068

<210> 8

<211> 2577

<212> ADN

5 <213> gen que codifica Butil-CoA dehidrogenasa (CAP0035)

<400> 8

ES 2 396 179 T3

atgaaagtta	caaatcaaaa	agaactaaaa	caaaagctaa	atgaattgag	agaagcgcaa	60
aagaagtttg	caacctatac	tcaagagcaa	gttgataaaa	tttttaaca	atgtgccata	120
gccgcagcta	aagaaagaat	aaacttagct	aaattagcag	tagaagaaac	aggaataggt	180
cttgtagaag	ataaaattat	aaaaaatcat	tttgcagcag	aatatatata	caataaatat	240
aaaaatgaaa	aaacttgtgg	cataatagac	catgacgatt	ctttaggcat	aacaaaggtt	300
gctgaaccaa	ttggaattgt	tgcagccata	gttctacta	ctaatacaac	ttccacagca	360
attttcaaat	cattaatttc	tttaaaaaca	agaaacgcaa	tattcttttc	accacatcca	420
cgtgcaaaaa	aatctacaat	tgctgcagca	aaattaattt	tagatgcagc	tgttaaagca	480
ggagcaccta	aaaatataat	aggctggata	gatgagccat	caatagaact	ttctcaagat	540
ttgatgagtg	aagctgatat	aatattagca	acaggaggtc	cttcaatggt	taaagcggcc	600
tattcatctg	gaaaacctgc	aattggtggt	ggagcaggaa	atacaccagc	aataatagat	660
gagagtgcag	atatagatat	ggcagtaagc	tccataattt	tatcaaagac	ttatgacaat	720
ggagtaatat	gcgcttctga	acaatcaata	ttagttatga	attcaatata	cgaaaaagtt	780
aaagaggaat	ttgtaaaacg	aggatcatat	atactcaatc	aaaatgaaat	agctaaaata	840
aaagaaacta	tgtttaaaaa	tggagctatt	aatgctgaca	tagttggaaa	atctgcttat	900
ataattgcta	aaatggcagg	aattgaagtt	cctcaaaacta	caaagatact	tataggcgaa	960
gtacaatctg	ttgaaaaaag	cgagctgttc	tcacatgaaa	aactatcacc	agtacttgca	1020
atgtataaag	ttaaggattt	tgatgaagct	ctaaaaaagg	cacaaaggct	aatagaatta	1080
ggtggaagtg	gacacacgtc	atctttatat	atagattcac	aaaacaataa	ggataaagtt	1140
aaagaatttg	gattagcaat	gaaaacttca	aggacattta	ttaacatgcc	ttcttcacag	1200
ggagcaagcg	gagatttata	caattttgcg	atagcaccat	catttactct	tggatgcggc	1260
acttggggag	gaaactctgt	atcgcaaaat	gtagagccta	aacatttatt	aatatataa	1320
agtgttgctg	aaagaagggg	aaatatgctt	tggtttaaaag	tgccacaaaa	aatatatttt	1380
aaatatggat	gtcttagatt	tgcattaaaa	gaattaaaag	atatgaataa	gaaaagagcc	1440
tttatagtaa	cagataaaga	tctttttaa	cttggatatg	ttaataaaat	aacaaaggtt	1500
ctagatgaga	tagatattaa	atacagtata	tttacagata	ttaaactctga	tccaactatt	1560
gattcagtaa	aaaaaggtgc	taaagaaatg	cttaactttg	aacctgatac	tataatctct	1620
attggtggtg	gatcgccaat	ggatgcagca	aaggttatgc	acttgttata	tgaatatcca	1680

ES 2 396 179 T3

gaagcagaaa ttgaaaatct agctataaac tttatggata taagaaagag aatatgcaat 1740  
 ttccctaaat taggtacaaa ggcgatttca gtagctattc ctacaactgc tggtagccgt 1800  
 tcagaggcaa caccttttgc agttataact aatgatgaaa caggaatgaa ataccttta 1860  
 acttcttatg aattgacccc aaacatggca ataatagata ctgaattaat gttaaataatg 1920  
 cctagaaaat taacagcagc aactggaata gatgcattag ttcattgctat agaagcatat 1980  
 gtttcggtta tggctacgga ttatactgat gaattagcct taagagcaat aaaaatgata 2040  
 tttaaatatt tgcctagagc ctataaaaaat gggactaacg acattgaagc aagagaaaaa 2100  
 atggcacatg cctctaatat tgcggggatg gcatttgcaa atgctttctt aggtgtatgc 2160  
 cattcaatgg ctcataaact tggggcaatg catcacgttc cacatggaat tgcttgtgct 2220  
 gtattaatag aagaagttat taaatataac gctacagact gtccaacaaa gcaaacagca 2280  
 ttccctcaat ataaatctcc taatgctaag agaaaatatg ctgaaattgc agagtatttg 2340  
 aatttaaagg gtactagcga taccgaaaag gtaacagcct taatagaagc tatttcaaag 2400  
 ttaaagatag atttgagtat tccacaaaat ataagtgccg ctggaataaa taaaaaagat 2460  
 ttttataata cgctagataa aatgtcagag cttgcttttg atgaccaatg tacaacagct 2520  
 aatcctaggt atccaattat aagtgaactt aaggatatct atataaaatc attttaa 2577

<210> 9

<211> 2589

<212> ADN

5 <213> gen que codifica Butil-CoA dehidrogenasa (CAP0162)

<400> 9

ES 2 396 179 T3

atgaaagtca caacagtaaa ggaattagat gaaaaactca aggtaattaa agaagctcaa	60
aaaaaattct cttgttactc gcaagaaatg gttgatgaaa tctttagaaa tgcagcaatg	120
gcagcaatcg acgcaaggat agagctagca aaagcagctg ttttggaac cggtatgggc	180
ttagttgaag acaaggttat aaaaaatcat tttgcaggcg aatacatcta taacaaatat	240
aaggatgaaa aaacctgcgg tataattgaa cgaaatgaac cctacggaat tacaaaaata	300
gcagaaccta taggagttgt agctgctata atccctgtaa caaacccac atcaacaaca	360
atatttaaat ccttaatatc ccttaaaact agaaatggaa ttttcttttc gcctcaccca	420
agggcaaaaa aatccacaat actagcagct aaaacaatac ttgatgcagc cgttaagagt	480
ggtgccccgg aaaatataat aggttgata gatgaacctt caattgaact aactcaatat	540
ttaatgcaaa aagcagatat aacccttgca actggtggtc cctcactagt taaatctgct	600
tattcttccg gaaaaccagc aataggtggt ggtccgggta acacccagc aataattgat	660
gaatctgctc atataaaaat ggcagtaagt tcaattatat tatccaaaac ctatgataat	720

ES 2 396 179 T3

ggtgttatat gtgcttctga acaatctgta atagtcttaa aatccatata taacaaggta 780  
 aaagatgagt tccaagaaag aggagcttat ataataaaga aaaacgaatt ggataaagtc 840  
 cgtgaagtga tttttaaaga tggatccgta aaccctaaaa tagtcggaca gtcagcttat 900  
 actatagcag ctatggctgg cataaaagta cctaaaacca caagaatatt aataggagaa 960  
 gttacctcct taggtgaaga agaacctttt gcccacgaaa aactatctcc tgttttggct 1020  
 atgtatgagg ctgacaattt tgatgatgct ttaaaaaaag cagtaactct aataaactta 1080  
 ggaggcctcg gccatacctc aggaatatat gcagatgaaa taaaagcacg agataaaata 1140  
 gatagattta gtagtgccat gaaaaccgta agaacctttg taaatatccc aacctcacia 1200  
 ggtgcaagtg gagatctata taattttaga ataccacctt ctttcacgct tggctgcgga 1260  
 ttttggggag gaaattctgt ttccgagaat gttgggtccaa aacatctttt gaatattaaa 1320  
 accgtagctg aaaggagaga aaacatgctt tggtttagag ttccacataa agtatatttt 1380  
 aagttcgggt gtcttcaatt tgctttaaaa gatttaaaag atctaaagaa aaaaagagcc 1440  
 tttatagtta ctgatagtga ccctataat ttaaactatg ttgattcaat aataaaaata 1500  
 cttgagcacc tagatattga ttttaaagta ttaataaagg ttggaagaga agctgatctt 1560  
 aaaaccataa aaaaagcaac tgaagaaatg tctctcttta tgccagacac tataatagct 1620  
 ttaggtgga cccctgaaat gagctctgca aagctaagt gggactata tgaacatcca 1680  
 gaagtaaaat ttgaagatct tgcaataaaa tttatggaca taagaaagag aatataact 1740  
 ttcccaaac tcggtaaaaa ggctatgta gttgcaatta caacttctgc tggttccggt 1800  
 tctgaggta ctcttttgc tttagtaact gacaataaca ctggaaataa gtacatgta 1860  
 gcagattatg aatgacacc aatatggca attgtagatg cagaacttat gatgaaaatg 1920  
 ccaaagggat taaccgctta ttcaggtata gatgcaactag taaatagtat agaagcatac 1980  
 acatccgtat atgcttcaga atacacaaac ggactagcac tagaggcaat acgattaata 2040  
 tttaaatatt tgctgaggc ttacaaaaac ggaagaacca atgaaaaagc aagagagaaa 2100  
 atggctcacg cttcaactat ggcaggtatg gcatccgcta atgcatttct aggtctatgt 2160  
 cattccatgg caataaaatt aagttcagaa cacaatattc ctagtggcat tgccaatgca 2220  
 ttactaatag aagaagtaat aaaatttaac gcagttgata atcctgtaa acaagcccct 2280  
 tgcccacaat ataagtatcc aaacaccata tttagatatg ctggaattgc agattatata 2340  
 aagcttggag gaaatactga tgaggaaaag gtagatctct taattaacaa aatacatgaa 2400  
 ctaaaaaaag ctttaaatat accaacttca ataaaggatg caggtgtttt ggaggaaaac 2460  
 ttctattcct cccttgatag aatatctgaa cttgcactag atgatcaatg cacaggcgt 2520

ES 2 396 179 T3

aatcctagat ttcctcttac aagtgagata aaagaaatgt atataaattg ttttaaaaaa 2580

caaccttaa 2589

<210> 10

<211> 1449

<212> ADN

5 <213> gen que codifica GabD

<400> 10

ES 2 396 179 T3

atgaaactta acgacagtaa cttattccgc cagcaggcgt tgattaacgg ggaatggctg 60  
 gacgccaaca atggtgaage catcgacgtc accaatccgg cgaacggcga caagctgggt 120  
 agcgtgccga aatggggcgc ggatgaaacc cgcgccgcta tcgacgccgc caaccgccc 180  
 ctgcccgcct ggcgcgcgct caccgccaaa gaacgcgcca ccattctgcg caactggttc 240  
 aatttgatga tggagcatca ggacgattta ggcgcgctga tgaccctcga acagggtaaa 300  
 ccaactggccg aagcgaagg cgaaatcagc tacgcccgt cctttattga gtggtttgcc 360  
 gaagaaggca aacgcattta tggcgacacc attcctggtc atcaggccga taaacgcctg 420  
 attgttatca agcagccgat tggcgtcacc ggggctatca cgccgtggaa cttcccggcg 480  
 gcgatgatta cccgcaaagc cggtcggcg ctggcagcag gctgcaccat ggtgctgaag 540  
 cccgccagtc agacgccgtt ctctgcgctg gcgctggcgg agctggcgat ccgcgcgggc 600  
 gttccggctg gggatattaa cgtggtcacc ggttcggcgg gcgcggtcgg taacgaactg 660  
 accagtaacc cgctggcgcg caaactgtcg tttaccggtt cgaccgaaat tggccgccag 720  
 ttaatggaac agtgcgcgaa agacatcaag aaagtgtcgc tggagctggg cggtaacgcg 780  
 ccgtttatcg tctttgacga tgccgacctc gacaaagccg tggaaaggcg gctggcctcg 840  
 aaattccgca acgccgggca aacctgcgtc tgcgcccaacc gcctgtatgt gcaggacggc 900  
 gtgtatgacc gttttgccga aaaattgcag caggcagtga gcaaactgca catcggcgac 960  
 gggctggata acggcgtcac catcgggccg ctgatcgatg aaaaagcggg agcaaaagtg 1020  
 gaagagcata ttgccgatgc gctggagaaa ggcgcgcgcg tggtttgccg cggtaaagcg 1080  
 cacgaacgcg gcggcaactt cttccagccg accattctgg tggacgttcc ggccaacgcc 1140  
 aaagtgtcga aagaagagac gttcggcccc ctgcgccgcg tgttccgctt taaagatgaa 1200  
 gctgatgtga ttgcgcaagc caatgacacc gagtttgccc ttgccgccta tttctacgcc 1260  
 cgtgatttaa gccgcgtctt ccgcgtgggc gaagcgtgg agtacggcat cgtcggcatc 1320  
 aataccggca ttatttccaa tgaagtggcc ccgttcggcg gcacaaagc ctcgggtctg 1380  
 ggtcgtgaag gttcgaagta tggcatcgaa gattacttag aaatcaaata tatgtgcatc 1440  
 ggtctttaa 1449

<210> 11

<211> 1287

<212> ADN

5 <213> gen que codifica DctA

<400> 11

ES 2 396 179 T3

atgaaaacct ctctgtttaa aagcctttac tttcaggtcc tgacagcgat agccattggg 60  
 attctccttg gccatttcta tcctgaaata ggcgagcaaa tgaaccgct tggcgacggc 120  
 ttcgttaagc tcattaagat gatcatcgct cctgtcatct tttgtaccgt cgtaacgggc 180  
 attgcgggca tggaaagcat gaaggcggtc ggctcgaccg gcgcagtcgc actgctttac 240  
 tttgaaattg tcagtaccat cgcgctgatt attggcttta tcatcgtaa cgctcgtcag 300  
 cctgggtgccg gaatgaacgt cgatccggca acgcttgatg cgaaagcggg agcggtttac 360  
 gccgatcagg cgaaagacca gggcattgtc gccttcatta tggatgtcat cccggcgagc 420  
 gtcattggcg catttgccag cggtaacatt ctgcaggtgc tgctgtttgc cgtactgttt 480  
 ggttttgccg tccaccgtct gggcagcaaa ggccaactga tttttaacgt catcgaaagt 540  
 ttctcgcagg tcattcttcg catcatcaat atgatcatgc gtctggcacc tattgggtgcg 600  
 ttcggggcaa tggcgtttac catcggtaaa tacggcgtcg gcacactggg gcaactgggg 660  
 cagctgatta tctgtttcta cattacctgt atcctgtttg tgggtgctggg attgggttca 720  
 atcgctaaag cgactggttt cagtatcttc aaatttatcc gctacatccg tgaagaactg 780  
 ctgattgtac tggggacttc atcttccgag tggcgctgc cgcgtatgct cgacaagatg 840  
 gagaaactcg gctgccgtaa atcgggtggg gggctgggca tcccgacagg ctactcgttt 900  
 aaccttgatg gcacatcgat atacctgaca atggcgggcg tgtttatcgc ccaggccact 960  
 aacagtcaga tggatatcgt ccaccaaatc acgctgttaa tcgtgttgct gctttcttct 1020  
 aaaggggccc caggggtaac gggtagtggc tttatcgtgc tggcggcgac gctctctgcg 1080  
 gtgggccatt tgccggtagc gggctctggc ctgatcctcg gtatcgaccg ctttatgtca 1140  
 gaagctcgtg cgctgactaa cctggtcggg aacggcgtag cgaccattgt cgttgctaag 1200  
 tgggtgaaag aactggacca caaaaaactg gacgatgtgc tgaataatcg tgcgccggat 1260  
 ggcaaaacgc acgaattatc ctcttaa 1287

<210> 12

<211> 44

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador Cat1f-SacI

<400> 12

tttcccagc tctgtgagc gattaaatga gtaaaggat aaag 44

<210> 13  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> cebador 4hbDb-Xabl  
 <400> 13  
 gctctagatt agataaaaaa gaggacatt cacaatatgg 40  
 <210> 14  
 10 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> cebador DctAf-EcoRI  
 15 <400> 14  
 ggaattcatg aaaacctctc tgtttaaag c 31  
 <210> 15  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> cebador DctAb-Xbal  
 <400> 15  
 gctctagatt aagaggataa ttcgtgcggtt ttgcc 35  
 25 <210> 16  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> cebador CAP0035f-Sacl

<400> 16  
 tttcccgagc tcatgaaagt tacaatcaa aaa 33  
 <210> 17  
 <211> 29  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador CAP0035b-Xbal  
 <400> 17  
 10 gctctagatt aaaatgcttt tatatagat 29  
 <210> 18  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> cebador CAP0162f-EcoRI  
 <400> 18  
 ggaattcatg aaagtcacaa cagtaaag 28  
 <210> 19  
 20 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador CAP0162b-Xbal  
 25 <400> 19  
 gctctagatt aagggtgttt tttaaa 26  
 <210> 20  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> cebador cat2 f-EcoRI  
 <400> 20  
 ggaattcatg gaggggaag agatatataa agag 34  
 <210> 21  
 5 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador cat2b-BamHI  
 10 <400> 21  
 cgggatcctt aaaatctctt ttaaattca ttcattaatg 40  
 <210> 22  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador ptbf-EcoRI  
 <400> 22  
 ggaattcatg attaagagtt ttaatgaaat tatcatg 37  
 20 <210> 23  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> cebador bukb-Xbal  
 <400> 23  
 gctctagatt attgtattc cttagctttt tctctcc 38

**REIVINDICACIONES**

1. Mutante que muestra elevada producción de 1,4-butanodiol, que es preparado introduciendo o amplificando genes que codifican enzimas que convierten succinato en 4-hidroxiacetil-CoA y 4-hidroxiacetil-CoA en 1,4-butanodiol, en un microorganismo capaz de producir succinato,
- 5 en el que el microorganismo capaz de producir succinato es una bacteria,
- el gen que codifica la enzima que convierte succinato en 4-hidroxiacetil-CoA es seleccionado del grupo que consiste en genes que codifican succinil-CoA transferasa, semialdehído de succinato dehidrogenasa, 4-hidroxiacetil-CoA dehidrogenasa y 4-hidroxiacetil-CoA dehidrogenasa, y
- 10 el gen que codifica la enzima que convierte 4-hidroxiacetil-CoA en 1,4-butanodiol es i) un gen que codifica 4-hidroxiacetil-CoA transferasa y un gen que codifica alcohol dehidrogenasa que reduce 4-hidroxiacetil-CoA; o ii) un gen que codifica fosfotransbutirilasa, un gen que codifica butiril quinasa y un gen que codifica alcohol dehidrogenasa que reduce 4-hidroxiacetil-CoA.
2. Mutante, según la reivindicación 1, en el que la bacteria es seleccionada entre el grupo que consiste en bacteria Rumen, *Corynebacterium species*, *Brevibacterium species* y *E. coli*.
- 15 3. Mutante, según la reivindicación 2, en el que la bacteria Rumen tiene genes inactivos que codifican i) lactato dehidrogenasa (*ldhA*) y piruvato-formato liase (*pf1*); ii) lactato dehidrogenasa (*ldhA*), piruvato-formato liasa (*Pfl*), fosfotransacetilasa (*pta*) y acetato quinasa (*ackA*); o (iii) lactato dehidrogenasa (*ldhA*), piruvato-formato liasa (*Pfl*) y fosfopiruvato carboxilasa (*Ppc*), y producen succinato con elevada concentración sin producción sustancial de otros ácidos orgánicos en condiciones anaeróbicas.
- 20 4. Mutante, según la reivindicación 2 ó 3, en el que la bacteria Rumen es seleccionada entre el grupo que consiste en *Mannheimia species*, *Actinobacillus species* y *Anaerobiospirillum species*.
5. Mutante, según la reivindicación 4, en el que la bacteria Rumen es seleccionada entre el grupo que consiste en *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) y *Mannheimia species* LPK (KCTC 10558BP), LPK4 y LPK7 (KCTC 10626BP).
- 25 6. Mutante, según la reivindicación 2, en el que el *E. coli* tiene genes inactivos que codifican fosfotransferasa (*ptsG*) y piruvato quinasa (*pykA* y *pykF*), y producen succinato en la concentración sin reducción sustancial de otros ácidos orgánicos en condiciones anaeróbicas.
7. Mutante, según la reivindicación 6, en el que el mutante de *E. coli* es W3110GFA.
- 30 8. Mutante, según la reivindicación 1, en el que el gen que codifica la enzima que convierte succinato en 4-hidroxiacetil-CoA se deriva de *Clostridium kluyveri*.
9. Mutante, según la reivindicación 1, en el que el gen que codifica la enzima que convierte 4-hidroxiacetil-CoA en 1,4-butanodiol se deriva de *Clostridium acetobutylicum*.
10. Mutante, según la reivindicación 1, en el que el alcohol dehidrogenasa es butil-CoA dehidrogenasa derivado de *Clostridium acetobutylicum*.
- 35 11. Mutante, según la reivindicación 1, en el que el mutante tiene un gen inactivo asociado con la conversión de semialdehído de succinato en succinato.
12. Mutante, según la reivindicación 1, en el que el gen asociado con la conversión de semialdehído de succinato en succinato es un gen que codifica semialdehído succínico dehidrogenasa.
- 40 13. Mutante, según la reivindicación 1, en el que un gen que codifica la proteína de transporte de C4-dicarboxilato (*DctA*), asociado con el transporte de succinato es introducida adicionalmente o amplificada en el mutante.
14. Método para la preparación de 1,4-butanodiol, que comprende:
- recultivar el mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en un medio que contiene una fuente de carbono, y
- 45 obtener 1,4-butanodiol del medio.

FIG. 1

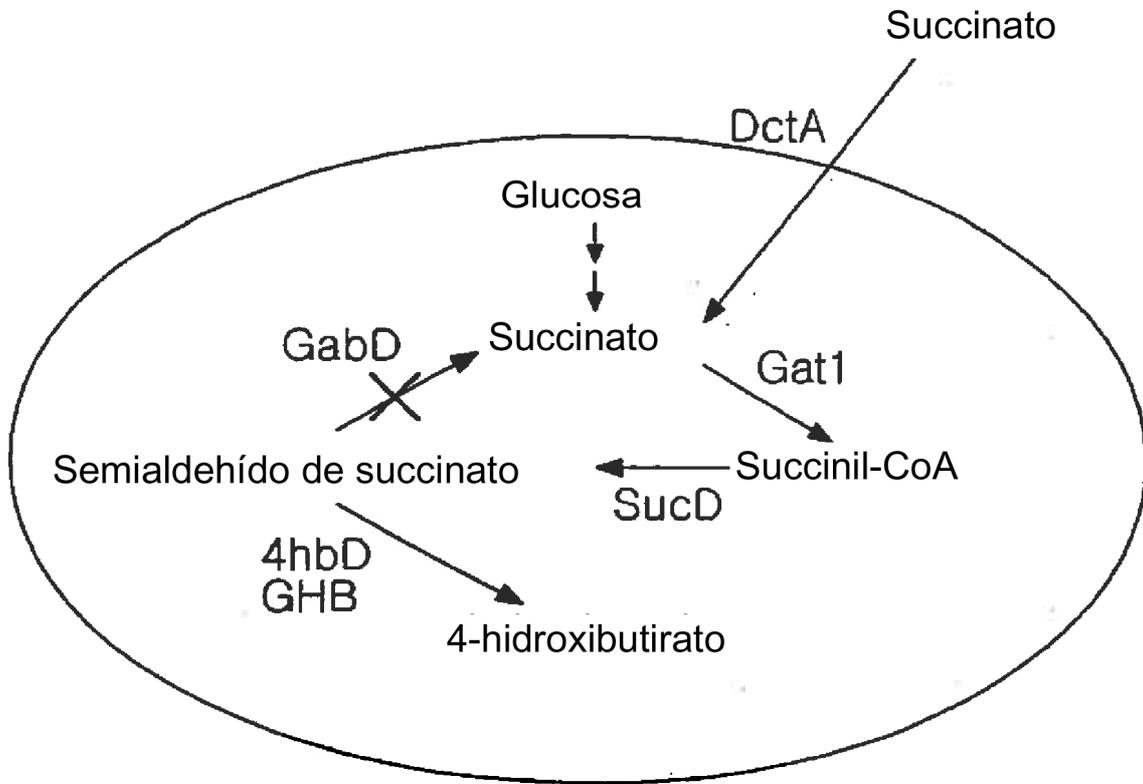


FIG. 2

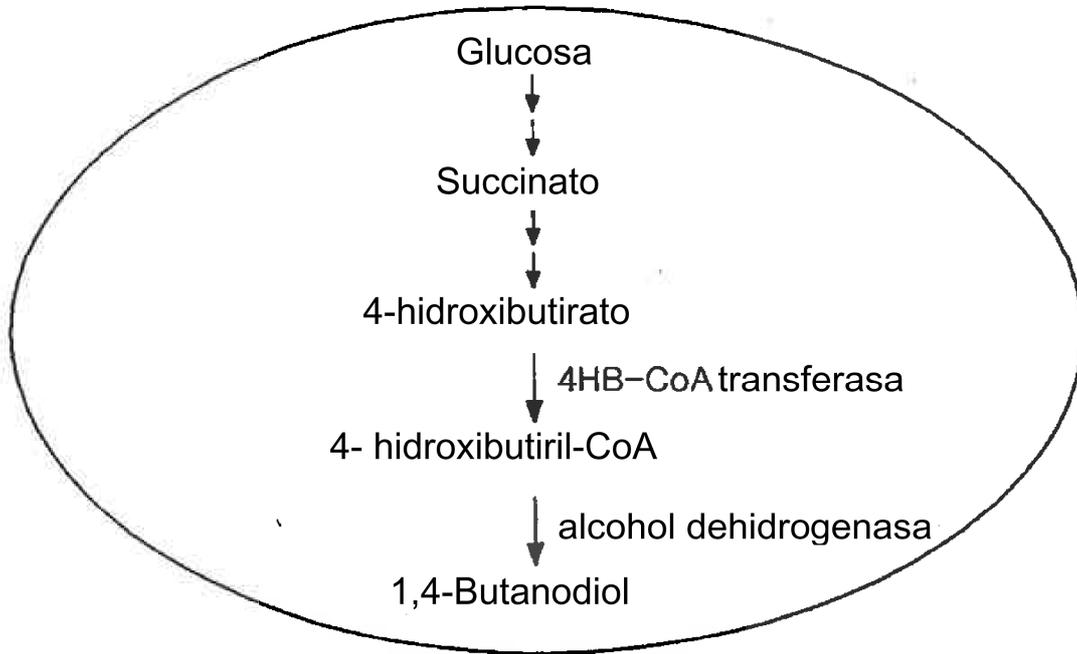


FIG. 3

