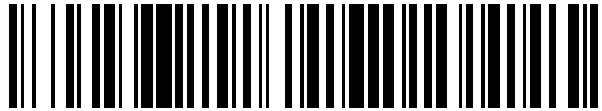


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 159**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2007 E 07793240 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2054502**

54 Título: **Microorganismo modificado por ingeniería genética novedoso que produce ácido homosuccínico y método para preparar ácido succínico usando el mismo**

30 Prioridad:

28.07.2006 KR 20060071666

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

30.05.2014

73 Titular/es:

**KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY (100.0%)
373-1, Gusung-dong
Yuseong-gu, Daejeon-city 305-701, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SANG YUP;
LIM, SUNG WON y
SONG, HYOHAK**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 464 159 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

Microorganismo modificado por ingeniería genética novedoso que produce ácido homosuccínico y método para preparar ácido succínico usando el mismo

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un mutante bacteriano del rumen que produce ácido homosuccínico y a un método para preparar ácido homosuccínico usando el mismo, y más particularmente a un mutante bacteriano del rumen que produce ácido succínico a alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias, que se obtiene alterando un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*), sin
10 alterar un gen que codifica para piruvato formiato liasa (*pfh*), así como a un método para preparar ácidos succínicos usando el mismo.

Técnica anterior

- 15 El ácido succínico ($\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), un ácido dicarboxílico que consiste en 4 carbonos, es un ácido orgánico que tiene muchas utilidades, que se usa ampliamente como precursor de medicamentos, alimentos, cosméticos y productos químicos de otras industrias (Zeikus *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol, 51:545, 1999; Song *et al.*, Enzyme Microbial Technol., 39:352, 2006). Particularmente, se espera que aumente drásticamente la demanda de ácido succínico como fuente principal de macromoléculas biodegradables, con el último aumento brusco de los precios del petróleo (Willke *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol, 66:131, 2004).

- 20 Puede producirse ácido succínico mediante síntesis química y fermentación. Sin embargo, la mayor parte del ácido succínico para uso industrial se produce actualmente a través de métodos de síntesis química usando n-butano y acetileno derivados del petróleo como material de partida por compañías químicas chinas, compañías químicas japonesas y grandes compañías químicas tales como BASF, DuPont, BP chemical etc., pero sólo una pequeña cantidad de ácido succínico para uso especial tal como medicamentos, etc. se produce mediante el método de fermentación microbiana tradicional. Los métodos de síntesis química mencionados anteriormente tienen el
25 problema de liberar grandes cantidades de desechos peligrosos, efluentes y gas de desecho (por ejemplo, CO, etc.) generados durante el proceso de producción de ácido succínico. Particularmente, se usan como material básico combustibles fósiles que tiene una alta posibilidad de agotarse y por tanto hay una necesidad urgente de desarrollar un método para preparar ácidos succínicos reemplazando los combustibles fósiles por combustibles alternativos tales como recursos renovables.

- 30 Para superar estos problemas provocados por el proceso de síntesis química para preparar ácido succínico, muchos investigadores han realizado de manera intensiva y amplia estudios sobre la producción de ácidos succínicos mediante fermentación microbiana usando diversos recursos renovables. Los microorganismos que se han usado en la producción de ácido succínico varían, pero pueden clasificarse generalmente en *Escherichia coli* recombinante y bacterias del rumen (*Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Bacteroides*, *Mannheimia*, *Succinimonas*, *Succinivibrio*, etc.)
35 (Song *et al.*, Enzyme Microbial Technol, 39:352, 2006).

- Entre los estudios sobre la producción de ácidos succínicos usando *E. coli* recombinante, hubo un intento de aumentar la producción de ácido succínico preparando un mutante AFP111 (n.º de la ATCC 202021) obtenido a través de un método en el que se manipula el gen de transporte de glucosa (*ptsG*) mientras que se eliminan los genes (*ldh* y *pfh*) que están implicados en la producción de ácido láctico y ácido fórmico en *E. coli*, por el equipo de investigación de la Universidad de Chicago (patente estadounidense n.º 5.770.435).
40

- Los presentes inventores han amplificado un gen de enzima málica (*sfcA*) implicado en la producción de ácido succínico, en *E. coli* recombinante, cepa NZN111, de la que se eliminan los genes *ldh* y *pfh*, para suprimir el ácido pirúvico acumulado en el proceso de fermentación de la cepa NZN111, aumentando así la producción de ácido succínico (Hong *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 74:89, 2001). También, un equipo de investigadores dirigidos por la Universidad de Georgia ha construido una cepa AFP111/pTrc99A-*pyc* que expresa un gen de piruvato carboxilasa (*pyc*) en la cepa AFP111, y entonces usaron esta cepa en la producción de ácido succínico (Vemuri *et al.*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 28:325, 2001). Recientemente, para inducir la producción de ácido succínico en condiciones anaerobias, un equipo de investigadores dirigidos por la Universidad de Rice notificaron que habían construido cepas de *E. coli* recombinante manipulando genes implicados en rutas de glicolisis, ciclo de TCA y glioxilato (Lin *et al.*, Eng., 7:116, 2005; Lin *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 90:775, 2005).
45
50

- Una cepa de *Actinobacillus*, una cepa de *Anaerobiospirillum* y una cepa de *Mannheimia*, que son una clase de bacterias del rumen, se sabe que son excelentes en la producción de ácido succínico, de modo que se han realizado activamente estudios sobre las cepas. Un equipo de investigadores dirigidos por el Instituto Biotecnológico de Michigan (MBI) en América descubrió *Actinobacillus succinogenes* cepa 130Z (n.º de la ATCC 55618) para desarrollar un método para producir ácido succínico, y construyó diversas cepas mutantes de *Actinobacillus succinogenes*, usando mutagénesis química tradicional para su uso en el desarrollo de un procedimiento para producir y purificar ácido succínico (patente estadounidense n.º 5.521.075; patente estadounidense n.º 5.168.055; patente estadounidense n.º 5.143.834).
55

Sin embargo, el procedimiento de producción de ácido succínico usando fermentación microbiana, desarrollado hasta ahora, tiene una productividad muy baja de menos de 2 g/l/h, y especialmente incurre en un gran coste para separar y purificar el ácido succínico porque se produce ácido succínico junto con grandes cantidades de diversos ácidos orgánicos y etanol como subproductos en algún grado durante la fermentación. Aunque los resultados mencionados anteriormente mostraron un efecto de disminución de ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético y etanol como subproductos en algunas cepas recombinantes, no mostraron una eliminación completa de los mismos. Además, en otras cepas mutantes recombinantes, había algunos casos en los que las tasas de crecimiento de las mismas se han vuelto tan bajas que la productividad de ácido succínico global no aumentó. Por tanto, hay una demanda urgente de desarrollar una cepa productora de ácido succínico novedosa, que tenga una alta productividad de ácido succínico y evite la producción de subproductos (Hong *et al.*, Biotechnol. Lett., 22:871, 2000).

Para desarrollar una cepa productora de ácido succínico novedosa para satisfacer las demandas anteriores, debe tener prioridad el aislamiento de una cepa que tenga una excelente productividad de ácido succínico, la compleción de la secuencia genómica de la misma, la comprensión de las características metabólicas de la misma y el establecimiento de una técnica de manipulación genética requerida para la construcción de una cepa recombinante. Hasta ahora, en el caso de bacterias del rumen que tienen alta productividad de ácido succínico, se completó la secuencia genómica completa de la cepa *M. succiniciproducens* MBEL 55E, pero las de bacterias del rumen tales como *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum* etc. aún no se han notificado. Aunque se ha notificado un intento de tratar de producir ácidos succínicos amplificando el gen de fosfoenolpiruvato carboxicinas (*pckA*) de *A. succinogenes* y *A. succiniciproducens* en *E. coli* (Kim *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 70:1238, 2004; Laivenieks *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 63:2273, 1997), no se ha intentado tratar de desarrollar una cepa de producción de ácido succínico recombinante basándose en la secuencia genómica.

Los presentes inventores han notificado que aislaron *M. succiniciproducens* MBEL 55E (KCTC0769BP) produciendo ácido succínico con alta eficacia a partir de ganado nativo coreano, y completaron la secuencia genómica y caracterizaron las propiedades metabólicas de la cepa (Hong *et al.*, Nature Biotechnol., 22: 1275, 2004). Además, los presentes inventores han construido un mutante bacteriano, *M. succiniciproducens* LPK (KCTC10558BP) alterando un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) y un gen que codifica para piruvato formiato-liasa (*pfh*) en *M. succiniciproducens* MBEL 55E que es una clase de bacteria del rumen para inhibir la producción de ácidos lácticos y ácidos fórmicos. Además de eso, las presentes invenciones han construido un mutante *M. succiniciproducens* LPK7 (KCTC1062BP) alterando un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) en la cepa mutante, *M. succiniciproducens* LPK para inhibir la producción de ácido acético, para cultivar los mutantes bacterianos en condiciones anaerobias (documento WO 05/052135 A1; Lee *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 72:1939, 2006), aumentando por tanto el ácido succínico. Sin embargo, en el caso de tales cepas mutantes, aunque pudo suprimirse la producción de subproductos, ácido fórmico y ácido acético en algún grado, se acumulaban una gran cantidad de ácidos pirúvicos como subproducto durante la fermentación, sobre todo, la tasa de crecimiento de la cepa se ha vuelto tan baja en comparación con una cepa silvestre que no podía lograrse una excelente productividad de ácido succínico.

Mientras tanto, se notificó que un gen de piruvato formiato-liasa (*pfh*) participa en la conversión de ácido pirúvico en acetil coenzima A (acetil-CoA), afectando así al crecimiento celular y la redistribución de ácido pirúvico (Wolfe, Microbial. Mol. Biol. Rev., 69:12, 2005).

El documento WO2007/030830 da a conocer determinados métodos y organismos para la producción de succinato acoplada al crecimiento.

Por consiguiente, los presentes inventores han hecho esfuerzos extensos para construir un microorganismo mutante que pueda producir ácidos homosuccínicos a un alto rendimiento minimizando la disminución en la tasa de crecimiento microbiano e inhibiendo completamente la formación de diversos subproductos incluyendo ácidos pirúvicos y para desarrollar a método de fermentación del mismo, y como resultado, han construido un mutante bacteriano *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) alterando un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) sin alterar un gen de piruvato formiato-liasa (*pfh*) en *M. succiniciproducens* MBEL55E que es una clase de bacteria del rumen, y entonces fermentaron la cepa mutante en condiciones anaerobias usando glucosa y glicerol como fuentes de carbono, y confirmaron que la cepa mutante puede producir ácido homosuccínico casi a un alto rendimiento, completando de ese modo la presente invención.

Sumario de la invención

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un microorganismo mutante que tiene alta tasa de crecimiento y productividad de ácido succínico y produce sólo ácido succínico a un alto rendimiento al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos durante el periodo de fermentación anaerobia.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir ácido homosuccínico sin la acumulación de otros subproductos, cultivando el microorganismo mutante usando glucosa y glicerol como fuentes de carbono en condiciones anaerobias.

Un aspecto de la invención se refiere a un mutante bacteriano que carece de un gen de lactato deshidrogenasa

(*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) al mismo tiempo que comprende un gen de piruvato formiato-liasa (*pfl*), mutante bacteriano que tiene la propiedad de producir sólo ácido succínico a una alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias, en el que el mutante bacteriano se selecciona del grupo que consiste en el género *Mannheimia*, el género *Actinobacillus* y el género *Anaerobiospirillum*.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para producir ácido succínico, comprendiendo el método las etapas de: cultivar el mutante bacteriano anterior en condiciones anaerobias; y recuperar ácido succínico del caldo de cultivo.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un mutante bacteriano *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), que carece de un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) al mismo tiempo que comprende un gen de piruvato formiato-liasa (*pfl*), mutante bacteriano que tiene la propiedad de producir ácido succínico a alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para producir el mutante bacteriano según la reivindicación 1, comprendiendo el método las etapas de:

(a) obtener un mutante bacteriano que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) alterando el gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) en el genoma de una bacteria que se selecciona del grupo que consiste en el género *Mannheimia*, el género *Actinobacillus* y el género *Anaerobiospirillum*, usando recombinación homóloga; y

(b) obtener un mutante bacteriano que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) alterando el gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y el gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) en el genoma del mutante bacteriano que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) usando recombinación homóloga.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para preparar ácido succínico, comprendiendo el método las etapas de: cultivar el mutante bacteriano *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) en condiciones anaerobias; y recuperar ácido succínico del caldo de cultivo.

La presente solicitud también da a conocer un mutante bacteriano del rumen que carece de un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) en un microorganismo que produce ácido succínico al mismo tiempo que sólo se mantiene un gen de piruvato formiato-liasa (*pfl*) en el microorganismo que produce ácido succínico, que tiene la propiedad de producir sólo ácido succínico a alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias.

Además, la presente solicitud da a conocer un mutante bacteriano del rumen *Mannhimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) que carece de un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) en *M. succiniciproducens* al mismo tiempo que se mantiene un gen de piruvato formiato-liasa (*pfl*) en *M. succiniciproducens*, que tiene la propiedad de producir ácido succínico a alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias.

Adicionalmente, la presente solicitud da a conocer un método para producir un microorganismo mutante, comprendiendo el método las etapas de: (a) obtener un mutante bacteriano del rumen que carece del gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) alterando un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) del genoma de la bacteria del rumen productora de ácido succínico usando recombinación homóloga; y (b) obtener un mutante bacteriano del rumen que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) alterando un gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*), del genoma del mutante bacteriano del rumen que carece del gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*), mediante recombinación homóloga.

Además, la presente solicitud da a conocer un método para producir ácido succínico, comprendiendo el método las etapas de: cultivar los mutantes bacterianos del rumen en condiciones anaerobias; y recuperar ácido succínico del caldo de cultivo.

Otras características y realizaciones de la presente invención se aclararán más a partir de las siguientes descripciones detalladas y reivindicaciones adjuntas.

50 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra la ruta de producción de ácido succínico en el microorganismo mutante según la presente invención.

La figura 2 muestra un procedimiento de construcción de un vector de reemplazamiento para alterar *ldhA* (pMLKO-sacB) mediante recombinación homóloga.

La figura 3 muestra un procedimiento de construcción de un mutante bacteriano (*M. succiniciproducens* LK) alterando el gen *ldhA* en *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E mediante recombinación homóloga.

La figura 4 muestra un procedimiento de construcción de un vector de reemplazamiento para alterar *pta* y *ackA* (pPTA-sacB) mediante recombinación homóloga.

5 La figura 5 muestra un procedimiento de construcción de un mutante bacteriano (*M. succiniciproducens* PALK) alterando los genes *ldhA* y *pta-ackA* en *M. succiniciproducens* LK mediante recombinación homóloga.

10 La figura 6 es una fotografía de electroforesis que muestra la alteración de *pta-ackA* en *M. succiniciproducens* PALK, en la que M representa un marcador de 1 kb; los carriles 1-6 representan fragmentos de PCR (1,1 kb) usando los cebadores PAU1 y SP1; los carriles A-F representan fragmentos de PCR (1,5 kb) usando los cebadores SP2 y PAD2.

La figura 7 muestra las características de cultivo de *M. succiniciproducens* PALK de la invención en condiciones anaerobias saturadas con CO₂.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

15 Un aspecto de la invención se refiere a un mutante bacteriano que carece de un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) al mismo tiempo que comprende un gen de piruvato formiato-liasa (*pfh*), mutante bacteriano que tiene la propiedad de producir sólo ácido succínico a una concentración alta al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias, en el que el mutante bacteriano se selecciona del grupo que consiste en el género *Mannheimia*, el género *Actinobacillus* y el género *Anaerobiospirillum*.

20 Una descripción adicional se refiere a un mutante bacteriano del rumen que carece de un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) en un microorganismo que produce ácido succínico al mismo tiempo que sólo se mantiene un gen de piruvato formiato-liasa (*pfh*) en el microorganismo que produce ácido succínico, que tiene la propiedad de producir sólo ácido succínico a una alta concentración al mismo tiempo produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias.

25 En la presente invención, el microorganismo productor de ácido succínico se refiere a un microorganismo que puede producir una gran cantidad excesiva de ácido succínico en comparación con la producción de etanol u otros ácidos orgánicos, que puede usarse para uso industrial en la producción de ácido succínico mediante fermentación.

30 Los microorganismos productores de ácido succínico típicos incluyen bacterias del rumen. A partir de información genética parcial (ARNr 16s), análisis enzimático y resultados de fermentación de *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens* que son una clase de bacterias del rumen y diversas bacterias del rumen que se sabe que producen ácido succínico hasta ahora, se encontró que la principal ruta de biosíntesis para la producción de ácido succínico a partir de una fuente de carbono en bacterias del rumen es casi idéntica a la ruta de biosíntesis para la producción de ácido succínico en *Mannheimia* sp. que es una clase de bacteria del rumen (tabla 1; Van der Werf *et al.*, Arch Microbiol., 167:332, 1997; Laivenieks *et al.*, Appl Environ. Microbiol., 63:2273, 1997; Samuelov *et al.*, App. Environ. Microbiol., 65:2260, 1999; Kim *et al.*, Appl Environ. Microbiol., 70:1238, 2004). Especialmente todas las bacterias del rumen que están implicadas en la producción de ácido succínico convierten fosfoenolpiruvato y piruvato, compuestos C3 en oxalacetato y malato, compuestos C4 usando enzima fijadora de CO₂ con la producción de ácido succínico, produciendo así ácido succínico. Además, las bacterias del rumen producen ácido acético, ácido fórmico y ácido láctico como subproductos de fermentación en condiciones anaerobias, lo que sugiere por tanto que todas las bacterias del rumen incluyendo *Mannheimia* sp. tienen la misma ruta para la biosíntesis de ácido succínico.

Tabla 1

Bacterias del rumen productoras de ácido succínico

Cepa	Referencias
<i>Cytophaga succinicans</i>	Anderson <i>et al.</i> , J. Bacteriol., 81:130, 1961
<i>Fibrobacter succinogens</i>	Wood <i>et al.</i> , J. Cereal. Sci., 19:65, 1994
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Iannotti <i>et al.</i> , Appl. Environ. Microbiol., 43:136, 1973
<i>Succinimonas amylolytica</i>	Bryant, Bacteriol. Rev., 23:125, 1959
<i>Succinivibrio dextrinisolvans</i>	Bryant, Bacteriol. Rev., 23:125, 1959
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Glutter <i>et al.</i> , Int. J. Syst. Bacteriol., 49:207, 1999
<i>Mannheimia succiniciproducens</i>	Hong <i>et al.</i> , Nature Biotechnol., 22:1275, 2004

45 En la presente invención, se construyó un microorganismo mutante productor de ácido succínico con una alta tasa de crecimiento, que puede producir ácido succínico a una alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos, manipulando el genoma de bacterias del rumen que son un microorganismo

5 productor de ácido succínico. En otras palabras, se alteraron un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) en el ADN genómico de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP), construyendo de ese modo un mutante bacteriano *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) que muestra una alta tasa de crecimiento y produce ácido succínico a una alta concentración al mismo tiempo produce poco o nada de otros ácidos orgánicos.

En la presente invención, para la alteración de cada gen, se usó un método de sustitución de los genes mediante recombinación homóloga para inactivar, pero puede usarse cualquier método sin limitaciones siempre que sea un método de manipulación genética en el que el gen correspondiente pueda modificarse o eliminarse, de manera que no se genere una enzima codificada por el gen correspondiente.

10 En la presente invención, las bacterias del rumen se seleccionan del grupo que consiste en *Mannheimia* sp., *Actinobacillus* sp. y *Anaerobiospirillum* sp.

15 En la presente invención, el microorganismo mutante es preferiblemente una cepa de fermentación homogénea que produce sólo ácido succínico al mismo tiempo que forma poco o nada de otros ácidos orgánicos como subproductos, las cantidades de otros ácidos orgánicos producidos son preferiblemente inferiores al 1% en peso basándose en la cantidad de ácido succínico producido, y los otros ácidos orgánicos son preferiblemente uno cualquiera o más ácidos orgánicos seleccionados del grupo que consiste en ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y ácido pirúvico.

20 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un mutante bacteriano *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), que carece de un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) al mismo tiempo que comprende un gen de piruvato formiato-liasa (*pff*), mutante bacteriano que tiene la propiedad de producir ácido succínico a una alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias.

25 Una descripción adicional se refiere a un mutante bacteriano del rumen *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), que carece de un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) en *M. succiniciproducens* al mismo tiempo que se mantiene un gen de piruvato formiato-liasa (*pff*) en *M. succiniciproducens*, que tiene la propiedad de producir ácido succínico a una alta concentración al mismo tiempo que se produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias.

30 El mutante bacteriano *M. succiniciproducens* LPK7 (KCTC10626BP), que se construyó alterando un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen que codifica para piruvato formiato-liasa (*pff*), un gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) en el genoma de *Mannheimia* sp., se usó para comparar la productividad de ácido succínico y tasa de crecimiento de *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) según la presente invención con las de mutantes bacterianos tradicionales. En el presente documento, el mutante bacteriano *M. succiniciproducens* LPK7 (KCTC10626BP) tiene una alteración adicional de un gen que codifica para piruvato formiato-liasa (*pff*) en la cepa mutante *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) según la presente invención (documento WO2005/052135; Lee *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 72:1939, 2006).

35 *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) según la presente invención tiene una alta productividad de ácido succínico y produce poco o nada de subproductos tales como ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y ácido pirúvico, mostrando por tanto excelentes propiedades en comparación con *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP) silvestre para la producción de ácido succínico y el mutante bacteriano previamente construido *M. succiniciproducens* LPK7 (KCTC10626BP), y puede producir ácido succínico a altos rendimientos debido a la alta tasa de crecimiento del mismo, alta productividad de ácido succínico y producción de ácido homosuccínico evitando la acumulación de ácido pirúvico, en comparación con el mutante bacteriano previamente construido *M. succiniciproducens* LPK7 (KCTC10626BP).

45 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para producir el mutante bacteriano según la reivindicación 1, comprendiendo el método las etapas de:

(a) obtener un mutante bacteriano que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) alterando el gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) en el genoma de una bacteria que se selecciona del grupo que consiste en el género *Mannheimia*, el género *Actinobacillus* y el género *Anaerobiospirillum*, usando recombinación homóloga; y

50 (b) obtener un mutante bacteriano que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) alterando el gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y el gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) en el genoma del mutante bacteriano que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) usando recombinación homóloga.

55 Todavía otra descripción se refiere a un método para construir un microorganismo mutante, comprendiendo el método las etapas de: (a) obtener un mutante bacteriano del rumen que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) alterando un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) en el genoma de bacterias del rumen productoras de ácido succínico usando recombinación homóloga; y (b) obtener un mutante bacteriano del

rumen que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) alterando un gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) en el genoma del mutante bacteriano del rumen que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) mediante recombinación homóloga.

- 5 En la presente invención, la recombinación homóloga de la etapa (a) se lleva a cabo preferiblemente usando un vector de intercambio genético que contiene un *ldhA* alterado, y la recombinación homóloga de la etapa (b) se lleva a cabo preferiblemente usando un vector de intercambio genético que contiene un *pta-ackA* alterado.

10 En la presente invención, el vector de intercambio genético que contiene un *ldhA* alterado es preferiblemente pMLKO-sacB, y el vector de intercambio genético que contiene un *pta-ackA* alterado es preferiblemente pMPKO-sacB.

La presente invención también proporciona un método para producir ácido succínico, comprendiendo el método las etapas de: cultivar el microorganismo mutante mencionado anteriormente en condiciones anaerobias; y recuperar ácido succínico del caldo de cultivo.

- 15 En la presente invención, para el cultivo, se usa preferiblemente glucosa o glicerol como fuente de carbono, y las cantidades de otros ácidos orgánicos producidos como subproductos son preferiblemente inferiores al 1% en peso basándose en la cantidad de ácido succínico producido.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para preparar ácido succínico, comprendiendo el método las etapas de: cultivar el mutante bacteriano *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) en condiciones anaerobias; y recuperar ácido succínico del caldo de cultivo.

- 20 Aún otra descripción se refiere a un método para preparar ácido succínico, comprendiendo el método las etapas de: cultivar el mutante bacteriano del rumen en condiciones anaerobias; y recuperar ácido succínico del caldo de cultivo.

El cultivo del microorganismo mutante productor de ácido succínico según la presente invención y el procedimiento de recuperación del ácido succínico pueden llevarse a cabo mediante los métodos de cultivo conocidos en el proceso de fermentación convencional y métodos para separar y purificar ácido succínico.

- 25 En la presente invención, para el cultivo, se usa preferiblemente glucosa o glicerol como fuente de carbono, y las cantidades de otros ácidos orgánicos producidos como subproductos son preferiblemente inferiores al 1% en peso basándose en la cantidad de ácido succínico producido.

Ejemplos

- 30 La presente invención se describirá a continuación en el presente documento con más detalles mediante ejemplos. Sin embargo, resultará obvio para un experto en la técnica que estos ejemplos se facilitan sólo para fines ilustrativos, y la presente invención no se limita a o por los ejemplos.

35 Particularmente, los siguientes ejemplos ilustran sólo *Mannheimia* sp. que es un microorganismo productor de ácido succínico como célula huésped para delecionar los genes según la presente invención. Sin embargo, resulta obvio para un experto en la técnica que puede obtenerse un microorganismo mutante que produce ácido homosuccínico incluso cuando se usan otras clases de microorganismos productores de ácido succínico.

Ejemplo 1: Construcción del vector de alteración de *ldhA* (pMLKO-sacB)

- 40 Para alterar el gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*) en el genoma de un microorganismo productor de ácido succínico mediante recombinación homóloga, se construyó un vector de intercambio genético de la siguiente manera. En primer lugar, se sometió el ADN genómico de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP), como molde, a PCR usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 a continuación y, entonces, se cortó el fragmento de PCR obtenido que contenía la región 1 homóloga a *ldhA* (L1) con *SacI* y *PstI* y se introdujo en el vector pUC18 (New England Biolabs, Inc., EE.UU.), construyendo de ese modo pUC18-L1.

SEQ ID NO: 1: 5'-CAGTGAAGGAGCTCCGTAACGCATCCGCCG

SEQ ID NO: 2: 5'-CTTTATCGAATCTGCAGGCGTTTCCAAAA

- 45 Además, se sometió el ADN genómico de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP), como molde, a PCR usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 a continuación y, entonces, se cortó el fragmento de PCR obtenido que contenía la región 2 homóloga a *ldhA* (L2) con *PstI* y *HindIII* y se introdujo en el pUC18-L1, construyendo de ese modo pUC18-L1-L2.

SEQ ID NO: 3: 5'-GTACTGTAAACTGCAGCTTTCATAGTTAGC

- 50 SEQ ID NO: 4: 5'-GCCGAAAGTCAAGCTTGCCGTCGTTTAGTG

Para insertar el gen resistente a kanamicina como marcador de selección en el pUC18-L1-L2, se cortó el vector pUC4K (Pharmacia, Alemania) con *Pst*I, y se fusionó el gen resistente a kanamicina resultante con pUC18-L1-L2 cortado con *Pst*I, construyendo de ese modo pUC18-L1-KmR-L2. Se insertó un ligador expuesto en SEQ ID NO: 5 en el pUC18-L1-KmR-L2 cortado con *Sac*I, produciendo de ese modo un nuevo sitio de corte de *Xba*I.

5 SEQ ID NO: 5: 5'-TCTAGAAGCT

Para insertar el gen *sacB* en el pUC18-L1-KmR-L2 en el que se ha insertado el sitio de corte de *Xba*I, se llevó a cabo PCR en pKmobSacB (Schafer *et al.*, Gene, 145:69, 1994) como molde usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 6 y 7. Entonces se cortó el fragmento de PCR resultante que contenía el gen *sacB* con *Xba*I, y se insertó en el nuevo sitio de enzima de restricción *Xba*I de pUC18-L1-KmR-L2 en el que se ha insertado el sitio de corte de *Xba*I anterior, construyendo de ese modo pMLKO-sacB, un vector de intercambio para alterar el gen *ldhA* (figura 2).

10 SEQ ID NO: 6: 5'-GCTCTAGACCTTCTATCGCCTTCTTGACG

SEQ ID NO: 7: 5'-GCTCTAGAGGCTACAAAATCACGGGCGTC

Ejemplo 2: Construcción de la cepa LK de *M. succiniciproducens*

15 Se construyó una cepa mutante alterando el gen *ldhA* en el genoma de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP) usando pMLKO-sacB construido en el ejemplo 1 como vector de intercambio genético para alterar el gen *ldhA* (figura 3).

20 En otras palabras, se sembró en placa *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP) en medio de agar LB-glucosa que contenía 10 g/l de glucosa, y se cultivó a 37°C durante 36 horas. Se inoculó la colonia formada en 10 ml de medio líquido de LB-glucosa, y se cultivó durante 12 horas. Se inoculó un 1% del caldo de cultivo, que se había hecho crecer suficientemente, en 100 ml de medio líquido de LB-glucosa, y se cultivó en una incubadora con agitación a 200 rpm y 37°C.

25 Cuando el caldo de cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,3-0,4 tras 4~5 horas, se centrifugó a 4°C y 4.500 rpm durante 20 minutos para recoger las células. Entonces, se resuspendieron las células en 200 ml de disolución de glicerol al 10% a 4°C. Se centrifugó la suspensión a 4°C y 5.500 rpm durante 20 minutos, y se recogieron las células. Tras resuspender y recoger en la mitad de la disolución de glicerol anterior dos veces de la misma manera que los procedimientos descritos anteriormente, se suspendieron las células en glicerol a una razón en volumen de 1:1, para obtener un concentrado celular.

30 Se mezcló el concentrado celular así obtenido con el vector de intercambio genético pMLKO-sacB construido en el ejemplo 1, y entonces se introdujo pMLKO-sacB en la *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP) cultivada mediante electroporación en condiciones de 1,8 kV, 25 µF y 200 ohmios. Se añadió 1 ml de medio líquido de LB-glucosa a la cepa con pMLKO-sacB introducido, y se cultivó previamente en una incubadora con agitación a 37°C y 200 rpm durante una hora. Se sembró en placa el caldo de cultivo en medio sólido de LB-glucosa que contenía el antibiótico kanamicina (concentración final de 25 µg/ml) y se cultivó a 37°C durante 48 horas o más. Para seleccionar una colonia en la que sólo se produjo doble sobrecruzamiento, se sembraron en estrías las colonias formadas en medio sólido de LB-sacarosa que contenía kanamicina (25 µg/ml) y sacarosa 100 g/l. Tras 24 horas, se sembraron en estrías de nuevo las colonias formadas en el mismo medio.

35 Se cultivaron las colonias (mutantes) formadas en el medio en medio líquido de LB-glucosa que contenía un antibiótico, y se aisló ADN genómico de la cepa cultivada mediante el método descrito en Rochelle *et al.* (Rochelle *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 100:59, 1992). Se llevó a cabo PCR usando el ADN genómico del mutante aislado como molde, y se sometió a electroforesis el producto de PCR para confirmar la alteración del gen *ldhA* en el ADN genómico.

40 Para confirmar la alteración del gen *ldhA*, se llevaron a cabo PCR dos veces de las siguientes maneras. En primer lugar, se sometió a PCR el ADN genómico mutante como molde usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

45 SEQ ID NO: 8: 5'-GACGTTTCCCGTTGAATATGGC (KM1)

SEQ ID NO: 9: 5'-CATTGAGGCGTATTATCAGGAAAC (LU1)

Entonces, se sometió a PCR el ADN genómico mutante como molde usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.

50 SEQ ID NO: 10: 5'-GCAGTTTCATTTGATGCTCGATG (KM2)

SEQ ID NO: 11: 5'-CCTCTTACGATGACGCATCTTTCC (LD2)

Se sometieron los fragmentos de PCR obtenidos en las dos PCR a electroforesis en gel para confirmar la alteración de *ldhA* por su tamaño. Se confirmaron los fragmentos de PCR del ADN genómico que tenían *ldhA* alterado

mediante el hecho de que el producto que resultaba de la PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 8 (KM1) y SEQ ID NO: 9 (LU1) tiene un tamaño de 1,5 kb, y al mismo tiempo el producto que resultaba de la PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 10 (KM2) y SEQ ID NO: 11 (LU2) tiene un tamaño de 1,7 kb. La posición de cada cebador se muestra en la figura 3.

- 5 Se construyó la cepa mutante *M. succiniciproducens* LK alterando el gen *ldhA* en el genoma de *M. succiniciproducens* MBEL55E según el método anterior.

Ejemplo 3: Construcción del vector de intercambio génico (pPTA-sacB) para la alteración de *pta* y *ackA*

- 10 Para alterar *pta* y *ackA* en el genoma de la cepa LK de *M. succiniciproducens* mediante recombinación homóloga, se construyó un vector de intercambio genético de la siguiente manera. Se sometió un vector pKmobSacB que contiene el gen *sacB*, como molde, a PCR usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. Se cortó el producto de *sacB* resultante con *Pst*I y *Bam*HI y se insertó en pUC19 (Stratagene Cloning Systems. EE.UU.), construyendo de ese modo pUC19-sacB (figura 4).

SEQ ID NO: 12: 5'-AGCGGATCCCCTTCTATCGCCTTCTTGACG

SEQ ID NO: 13: 5'-GTCCTGCAGGGCTACAAAATCACGGGCGTC

- 15 Mientras tanto, se sometió el ADN genómico de *M. succiniciproducens* LK como molde a PCR usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, y se cortó el fragmento de PCR resultante que contenía la región 1 homóloga 1 a *pta-ackA* con *Xba*I y *Bam*HI. Además, se sometió el ADN genómico de *M. succiniciproducens* LK como molde a PCR usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, y se cortó el fragmento de PCR resultante que contenía la región 2 homóloga a *pta-ackA* con *Xba*I y *Sac*I. Entonces, se insertaron estos
20 fragmentos en el sitio *Bam*HI y *Sac*I de pUC19, construyendo de ese modo pUC19-PTA12.

SEQ ID NO: 14: 5'-GCTCTAGATATCCGCAGTATCACTTTCTGCGC

SEQ ID NO: 15: 5'-TCCGCAGTCGGATCCGGGTTAACCGCACAG

SEQ ID NO: 16: 5'-GGGGAGCTCGCTAACTTAGCTTCTAAAGGCCA

TGTTTCC

- 25 SEQ ID NO: 17: 5'-GCTCTAGATATCCGGGTCAATATCGCCGCAAC

- Para insertar el gen resistente a espectinomicina (GenBank X02588; *SpR*) como marcador selectivo en pUC19-PTA12, se sometió a PCR el plásmido pIC156 (Steinmetz *et al.*, *Gene*, 142:79, 1994) que contiene el gen resistente a espectinomicina (GenBank X02588), como molde, usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, y se cortó el fragmento de PCR resultante que contenía el gen *SpR* con *Eco*RV y se introdujo en el pUC19-PTA12, construyendo de ese modo pUC19-PTA1S2 que tiene el gen resistente a espectinomicina. Se cortó el pUC19-PTA1S2 construido con *Sac*I y *Bam*HI y se introdujo en el pUC19-SacB construido anteriormente, construyendo de ese modo un vector de intercambio (pPTA-sacB) para la alteración de *pta* y *ackA* (figura 4).

SEQ ID NO: 18: 5'-GAATTCGAGCTCGCCCGGGGATCGATCCTC

SEQ ID NO: 19: 5'-CCCGGGCCGACAGGCTTTGAAGCATGCAAATGTCAC

- 35 Ejemplo 4: Construcción de la cepa PALK de *M. succiniciproducens*

Se construyó una cepa mutante alterando el gen *pta* y *ackA* en el genoma de *M. succiniciproducens* LK usando pPTA-sacB, un vector de intercambio para la alteración del gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y el gen de acetato cinasa (*ackA*) construido en ejemplo 3 (figura 4).

- 40 En otras palabras, se sembró en placa *M. succiniciproducens* LK construida en el ejemplo 2 en medio de agar LB-glucosa que contenía 10 g/l de glucosa, y se cultivó a 37°C durante 36 horas. Se inoculó la colonia formada en 10 ml de medio líquido de LB-glucosa, y se cultivó durante 12 horas. Se inoculó un 1% del caldo de cultivo, que se había hecho crecer suficientemente, en 100 ml de medio líquido de LB-glucosa, y se cultivó en una incubadora con agitación a 200 rpm y 37°C.

- 45 Se recogió el concentrado celular del caldo de cultivo resultante de la misma manera que se describió en el ejemplo 2. Se mezcló el concentrado celular recogido con el vector de intercambio genético pPTA-sacB construido en el ejemplo 3, y entonces se introdujo pPTA-sacB en la *M. succiniciproducens* LK mediante electroporación en condiciones de 2,5 kV, 50 µF y 200 ohmios. Se añadieron 800 ml de medio líquido de LB-glucosa a la cepa con pPTA-sacB introducido, y se cultivó previamente en un termostato a 37°C durante una hora y media. Para inducir un doble sobrecruzamiento, se sembró en placa el caldo de cultivo en medio sólido de TSB-sacarosa (medio sólido de caldo de soja triéptica (Becton, Dickinson and Company) que contiene 100 g/l de sacarosa) que contenía el antibiótico
50 espectinomicina (concentración final de 50 µg/ml) y se cultivó a 37°C durante 48 horas o más. Para seleccionar una

colonia en la que sólo se produjo doble sobrecruzamiento, se sembraron en estrías las colonias formadas en medio de TSB-sacarosa que contenía espectinomicina 50 µg/ml y medio de agar TSB que contenía ampicilina 50 µg/ml, respectivamente, y se cultivaron a 37°C durante 12 horas. Entonces, se seleccionaron las colonias que se formaron en el medio de TSB-sacarosa que contenía espectinomicina 50 µg/ml pero que no se formaron en el medio de TSB que contenía ampicilina 50 µg/ml, y se sembraron en estrías de nuevo en el medio de TSB-sacarosa que contenía espectinomicina 50 µg/ml. Se seleccionaron las colonias formadas en el presente documento de nuevo usando el medio que contenía espectinomicina y el medio que contenía ampicilina, y entonces se seleccionaron en última instancia las colonias que mostraban los resultados requeridos. Se amplificó el ADN genómico del mutante aislado como molde mediante PCR y se sometió a electroforesis el producto de PCR para confirmar la alteración de *pta-ackA*.

Para confirmar la alteración de *pta-ackA*, se llevaron a cabo PCR dos veces de la siguiente manera. En primer lugar, se sometió a PCR el ADN genómico mutante como molde usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21. Entonces, se sometió a PCR el ADN genómico mutante como molde usando los cebadores expuestos en SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23.

SEQ ID NO: 20: 5'-CCTGCAGGCATGCAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTC (SP1)

SEQ ID NO: 21: 5'-GCTGCCAAACAACCGAAAATACCGCAATAAACGGC (PAU1)

SEQ ID NO: 22:

5'-GCATGTAACCTTACTGGATATAGCTAGAAAAGGCATCGGGGAG (SP2)

SEQ ID NO: 23:

5'-GCAACGCGAGGGTCAATACCGAAGGATTTCCGCG (PAD2)

Se sometieron los productos obtenidos en las dos PCR a electroforesis en gel para confirmar la alteración de *pta-ackA* por su tamaño (figura 6). Se confirmó la alteración de *pta-ackA* por el hecho de que el producto que resultaba de la PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 (cebador SP1 y cebador PAU1) tiene un tamaño de 1,1 kb, y al mismo tiempo el producto que resultaba de la PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 (cebador SP2 y cebador PAD2) tiene un tamaño de 1,5 kb. La posición de cada cebador se muestra en la figura 5.

La cepa mutante construida mediante la alteración de *pta-ackA* del genoma de *M. succiniciproducens* LK como el método descrito anteriormente, es decir, una cepa mutante que resultaba de la alteración de *ldhA*, *pta* y *ackA* del genoma de *M. succiniciproducens*, se denominó "*M. succiniciproducens* PALK" y se depositó con el número de registro "KCTC10973BP" el 26 de julio de 2006 en la Korean Collection for Type Cultures (KCTC; 52, Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon-si, República de Corea), Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology, que es una autoridad depositaria internacional.

Ejemplo 5: Producción de ácido homosuccínico usando *M. succiniciproducens* PALK

Se sembró en placa *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) construida en el ejemplo 4 en 10 ml de medio de composición que contenía 5 g/l de glucosa, y se cultivó en condiciones anaerobias a 39°C durante 8 horas, y entonces se cambió de nuevo a 250 ml de medio de composición que contenía 5 g/l de glucosa y se cultivó a 39°C. En este momento, se añadió espectinomicina 50 µg/ml al medio como antibiótico. Se inocularon 250 ml del caldo de cultivo de *M. succiniciproducens* PALK en el biorreactor que contenía 2,25 l de medio de composición (1 g/l de NaCl, 2 g/l de (NH₄)₂HPO₄, 0,02 g/l de CaCl₂·2H₂O, 0,2 g/l de MgCl₂·6H₂O, 8,709 g/l de K₂HPO₄, 0,5 g/l de cisteína, 0,5 g/l de metionina, 0,5 g/l de alanina, 0,5 g/l de asparagina, 0,5 g/l de ácido aspártico, 0,5 g/l de prolina, 0,5 g/l de serina, 0,005 g/l de ácido nicotínico, 0,005 g/l de Ca-pantotenato, 0,005 g/l de piridoxina·HCl, 0,005 g/l de tiamina, 0,005 g/l de ácido ascórbico y 0,005 g/l de biotina), y se llevó a cabo la fermentación en condiciones de una primera concentración de glucosa de 18,2 g/l (100 mM), una primera concentración de glicerol de 9,2 g/l (100 mM) a 39°C. Durante la fermentación, se ajustó el pH del cultivo a 6,5 usando agua amoniacal, y se añadió espectinomicina 50 µg/ml al medio como antibiótico. Para producir ácido succínico a una alta concentración, siempre que la glucosa se agotaba completamente, se ajustó la concentración de glucosa del caldo de cultivo a aproximadamente 18,2 g/l (100 mM) añadiendo disolución de glucosa concentrada.

Se fermentaron *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP) y la cepa mutante productora de ácido succínico *M. succiniciproducens* LPK7 (KCTC10626BP) para producir ácido succínico de la misma manera que se describió anteriormente.

Se midió la concentración de células en el caldo de cultivo con un espectrofotómetro, y entonces se calculó usando la absorción de luz medida previamente del espectrofotómetro y la prueba de verificación para peso de células secadas. Durante la fermentación, se recogieron muestras del biorreactor regularmente. Se centrifugaron las muestras recogidas a 13.000 rpm durante 10 minutos, y entonces se usaron los sobrenadantes para analizar las concentraciones de ácidos orgánicos, glucosa, y glicerol usando cromatografía de líquidos de alta resolución.

5 Como resultado, cuando se comparó *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) de la presente invención con *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP) y *M. succiniciproducens* LPK7 (KCTC10626BP), mostró una productividad más alta de ácido succínico al mismo tiempo que producía poco o nada de otros ácidos orgánicos como subproductos que *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP) y *M. succiniciproducens* LPK7 (KCTC10626BP) tal como se muestra en la figura 7 y la tabla 2. Aunque se detectaron 0,45 g/l de ácido acético y 0,24 g/l de ácido pirúvico, resulta obvio para un experto en la técnica que estas cantidades son las cantidades mínimas de ácidos orgánicos producidos por una cepa para crecer y pueden ignorarse porque se produjeron en cantidades de menos del 1% en peso en comparación con el ácido succínico producido.

Tabla 2

10 Productividad de ácido succínico de *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP)

Cepa	MBEL55E (KCTC0769BP)	LPK7 (KCTC10626BP)	PALK (KCTC10973BP)
Concentración final de ácido succínico (g/l)	10,49	13,40	45,79
Consumo de glucosa (g/l)	22,50	19,98	53,00
Rendimiento de ácido succínico (g de ácido succínico/g de glucosa)	0,47	0,67	0,86
Tasa de aumento de ácido succínico en comparación con la cepa silvestre (MBEL55E) (%)	-	42,55	82,98
Concentración final de ácido acético (g/l)	4,96	0,53	0,45
Concentración final de ácido láctico (g/l)	3,47	0,27	0,00
Concentración final de ácido pirúvico (g/l)	0,00	2,47	0,24
Tasa de crecimiento específico celular (1/h)	0,81	0,30	0,69

Aplicabilidad industrial

15 Tal como se describió y proporcionó anteriormente en detalle, la presente invención proporciona el microorganismo mutante productor de ácido succínico que tiene una alta tasa de crecimiento, que produce ácido succínico a una alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos durante el cultivo en condiciones anaerobias, y el método para producir ácido succínico usando el mismo. El microorganismo mutante de la invención tiene la capacidad de tener una alta tasa de crecimiento y productividad de ácido succínico al mismo tiempo que produce poco o nada de ácidos orgánicos, en comparación con las cepas anteriores que producen ácido succínico. Por tanto, el microorganismo mutante de la invención es útil para producir ácido succínico para uso industrial.

Lista de Secuencias

<110> Instituto de Ciencia y Tecnología de Corea

20 <120> Microorganismo modificado por ingeniería genética novedoso que produce ácido homosuccínico y método para preparar ácido succínico usando el mismo

<130> PP-80304

<150> KR10-2006-0071666

<151> 28-07-2006

25 <160> 23

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

cagtgaagga gctccgtaac gcatccgccg

30

35 <210> 2

<211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> cebador
 <400> 2
 cttatcgaa tctgcaggcg gttccaaaa 30
 <210> 3
 <211> 30
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 3
 15 gtactgtaa ctgcagctt catagtagc 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cebador
 <400> 4
 gccgaaagtc aagcttgccg tcgtttagtg 30
 <210> 5
 25 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sitio xbal
 30 <400> 5
 tctagaagct 10
 <210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador

	<400> 6	
	gctctagacc ttctatcgcc ttctgacg	29
	<210> 7	
	<211> 29	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 7	
10	gctctagagg ctacaaaatc acgggcgctc	29
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 8	
	gacgttccc gtgaaatg gc	22
	<210> 9	
20	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 9	
	cattgaggcg tattatcagg aaac	24
	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 10	
	gcagttcat ttgatgctcg atg	23
35	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 11	
5	cctcttacga tgacgcatct tcc	24
	<210> 12	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 12	
	agcggatccc ctctatcgc ctcttgacg	30
	<210> 13	
15	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 13	
	gtcctgcagg gctacaaaat cacgggctc	30
	<210> 14	
	<211> 32	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 14	
	gctctagata tccgagtat cactttctgc gc	32
30	<210> 15	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador	
	<400> 15	
	tccgcagtgc gatccgggtt aaccgcacag	30

	<210> 16	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 16	
	ggggagctcg ctaacttagc ttctaaaggc catgttcc	39
	<210> 17	
10	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
15	<400> 17	
	gctctagata tccgggtcaa tatcgccgca ac	32
	<210> 18	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 18	
	gaattcgagc tcgcccgggg atcgatcctc	30
25	<210> 19	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 19	
	cccgggccga caggcttga agcatgcaaa tgtcac	36
	<210> 20	
	<211> 36	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

<223> cebador
 <400> 20
 cctgcaggca tgcaagcttg ggctgcaggt cgactc 36
 <210> 21
 5 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 21
 gctgccaaac aaccgaaaat accgcaataa acggc 35
 <210> 22
 <211> 43
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 22
 gcatgtaact ttactggata tagctagaaa aggcacggg gag 43
 20 <210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 23
 gcaacgcgag ggtaataacc gaaggatttc gccg 34

REIVINDICACIONES

1. Mutante bacteriano que carece de un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*) al mismo tiempo que comprende un gen de piruvato formiato-liasa (*pf*), mutante bacteriano que tiene la propiedad de producir sólo ácido succínico a una alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias, en el que el mutante bacteriano se selecciona del grupo que consiste en el género *Mannheimia*, el género *Actinobacillus* y el género *Anaerobiospirillum*.
2. Mutante bacteriano según la reivindicación 1, en el que el mutante bacteriano es una cepa de fermentación homogénea que produce sólo ácido succínico al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos como subproductos.
3. Mutante bacteriano según la reivindicación 1, en el que la cantidad de cada uno de los otros ácidos orgánicos producidos como subproductos es inferior al 1% en peso basándose en la cantidad de ácido succínico producido.
4. Mutante bacteriano según la reivindicación 1, en el que los otros ácidos orgánicos son uno cualquiera o más ácidos orgánicos seleccionados del grupo que consiste en ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y ácido pirúvico.
5. Mutante bacteriano *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), que carece de un gen de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen de fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen de acetato cinasa (*ackA*), al mismo tiempo que comprende un gen de piruvato formiato-liasa (*pf*), mutante bacteriano que tiene la propiedad de producir ácido succínico a una alta concentración al mismo tiempo que produce poco o nada de otros ácidos orgánicos en condiciones anaerobias.
6. Método para producir el mutante bacteriano según la reivindicación 1, comprendiendo el método las etapas de:
 - (a) obtener un mutante bacteriano que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) alterando el gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) en el genoma de una bacteria que se selecciona del grupo que consiste en el género *Mannheimia*, el género *Actinobacillus* y el género *Anaerobiospirillum*, usando recombinación homóloga; y
 - (b) obtener un mutante bacteriano que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y un gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) alterando el gen que codifica para fosfotransacetilasa (*pta*) y el gen que codifica para acetato cinasa (*ackA*) en el genoma del mutante bacteriano que carece de un gen que codifica para lactato deshidrogenasa (*ldhA*) usando recombinación homóloga.
7. Método para producir el mutante bacteriano según la reivindicación 6, en el que la recombinación homóloga de la etapa (a) se realiza usando un vector de intercambio genético que contiene un *ldhA* alterado.
8. Método para producir el mutante bacteriano según la reivindicación 6, en el que la recombinación homóloga de la etapa (b) se realiza usando un vector de intercambio genético que contiene un *pta-ackA* alterado.
9. Método para producir el mutante bacteriano según la reivindicación 7, en el que el vector de intercambio genético que contiene un *ldhA* alterado es pMLKO-sacB.
10. Método para producir el mutante bacteriano según la reivindicación 8, en el que el vector de intercambio genético que contiene un *pta-ackA* alterado es pMPKO-sacB.
11. Método para producir ácido succínico, comprendiendo el método las etapas de: cultivar el mutante bacteriano según una reivindicación cualquiera entre las reivindicaciones 1 a 4 en condiciones anaerobias; y recuperar ácido succínico del caldo de cultivo.
12. Método para producir ácido succínico según la reivindicación 11, en el que se usa glucosa o glicerol como fuente de carbono para el cultivo.
13. Método para preparar ácido succínico según la reivindicación 11, en el que la cantidad de cada uno de los otros ácidos orgánicos producidos como subproductos es inferior al 1% en peso basándose en la cantidad de ácido succínico producido.
14. Método para preparar ácido succínico, comprendiendo el método las etapas de: cultivar el mutante bacteriano *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) en condiciones anaerobias; y recuperar ácido succínico del caldo de cultivo.
15. Método para preparar ácido succínico según la reivindicación 14, en el que se usa glucosa o glicerol como

fFuente de carbono para el cultivo.

16. Método para preparar ácido succínico según la reivindicación 14, en el que la cantidad de cada uno de los otros ácidos orgánicos producidos como subproductos es inferior al 1% en peso basándose en la cantidad de ácido succínico producido.

5

FIG. 1

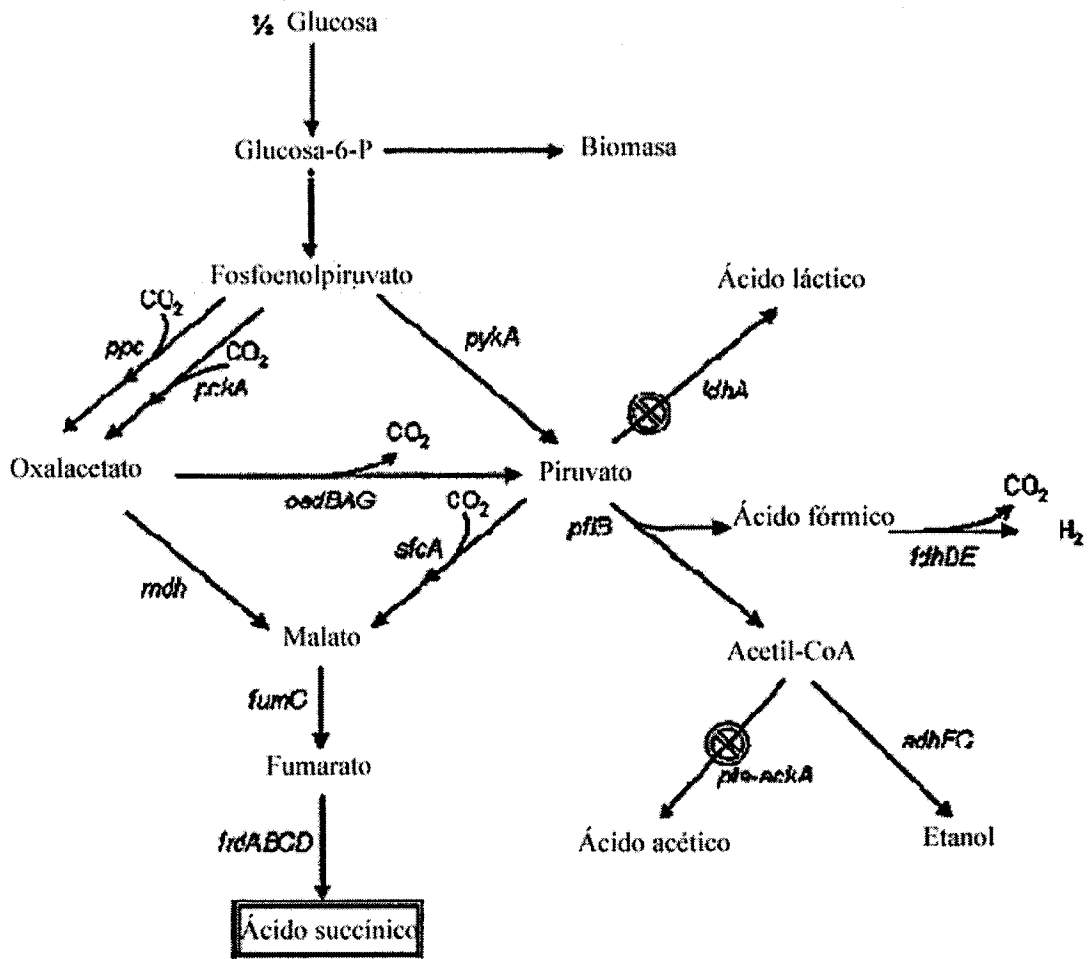


FIG. 2

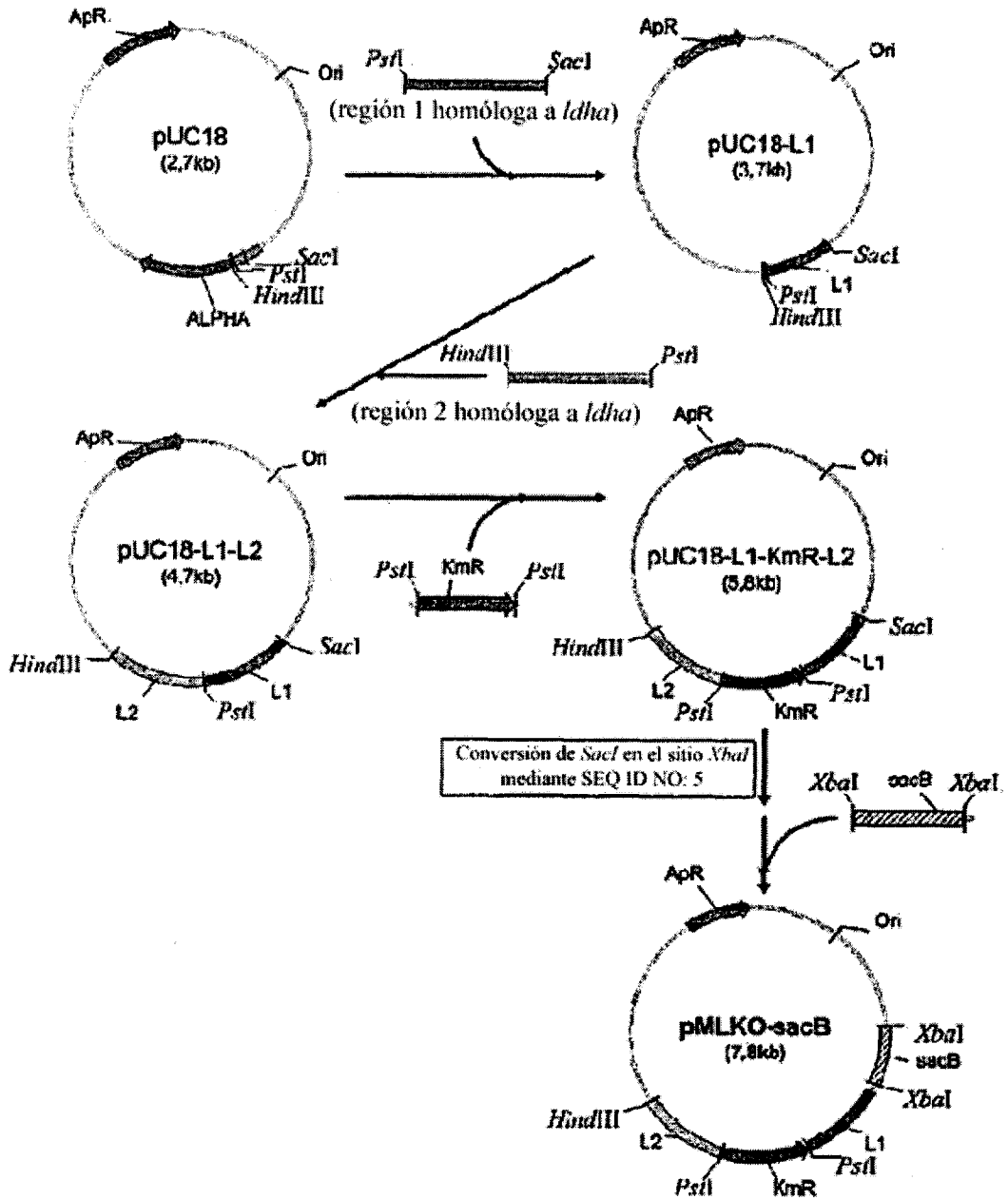


FIG. 3

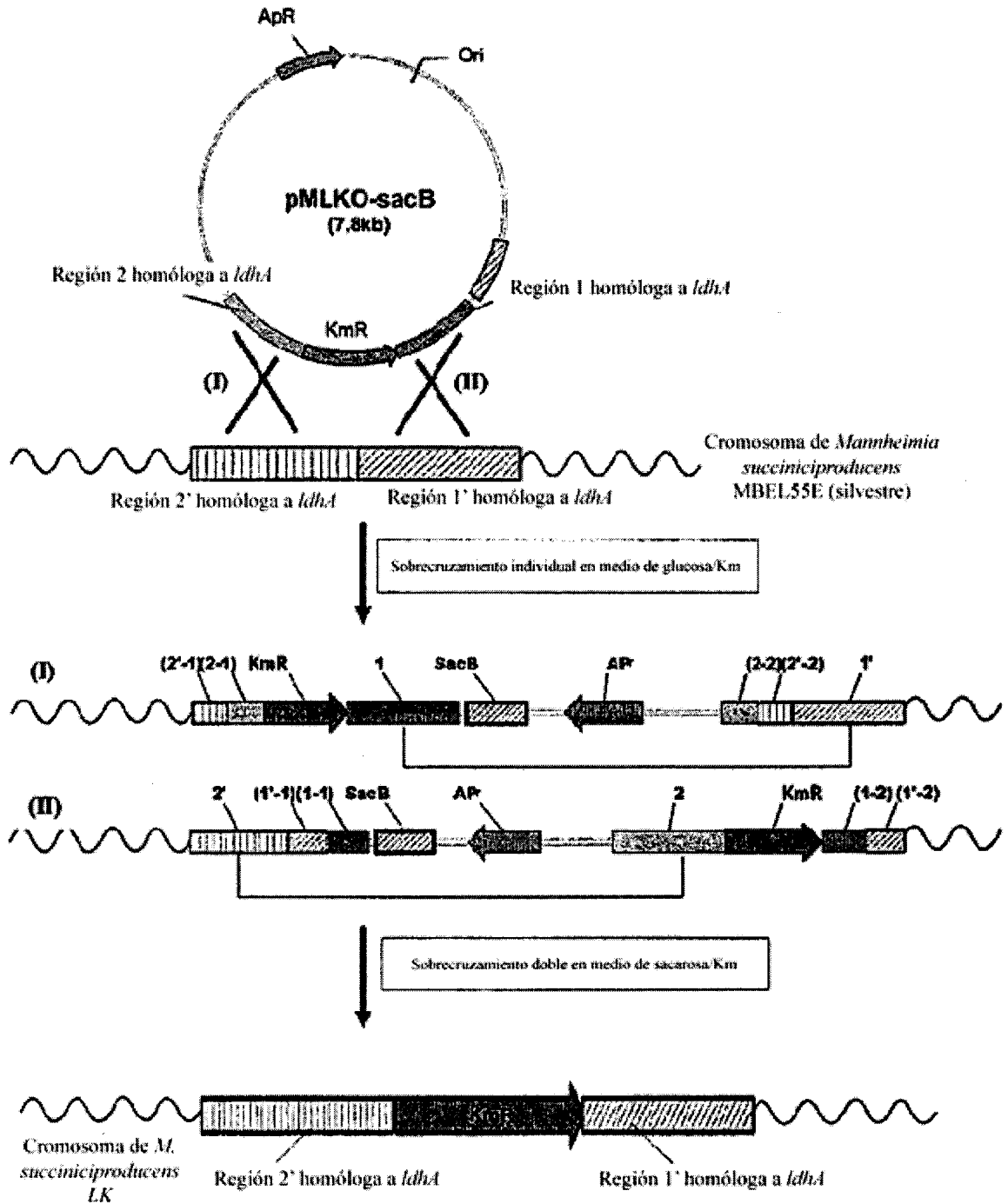


FIG. 4

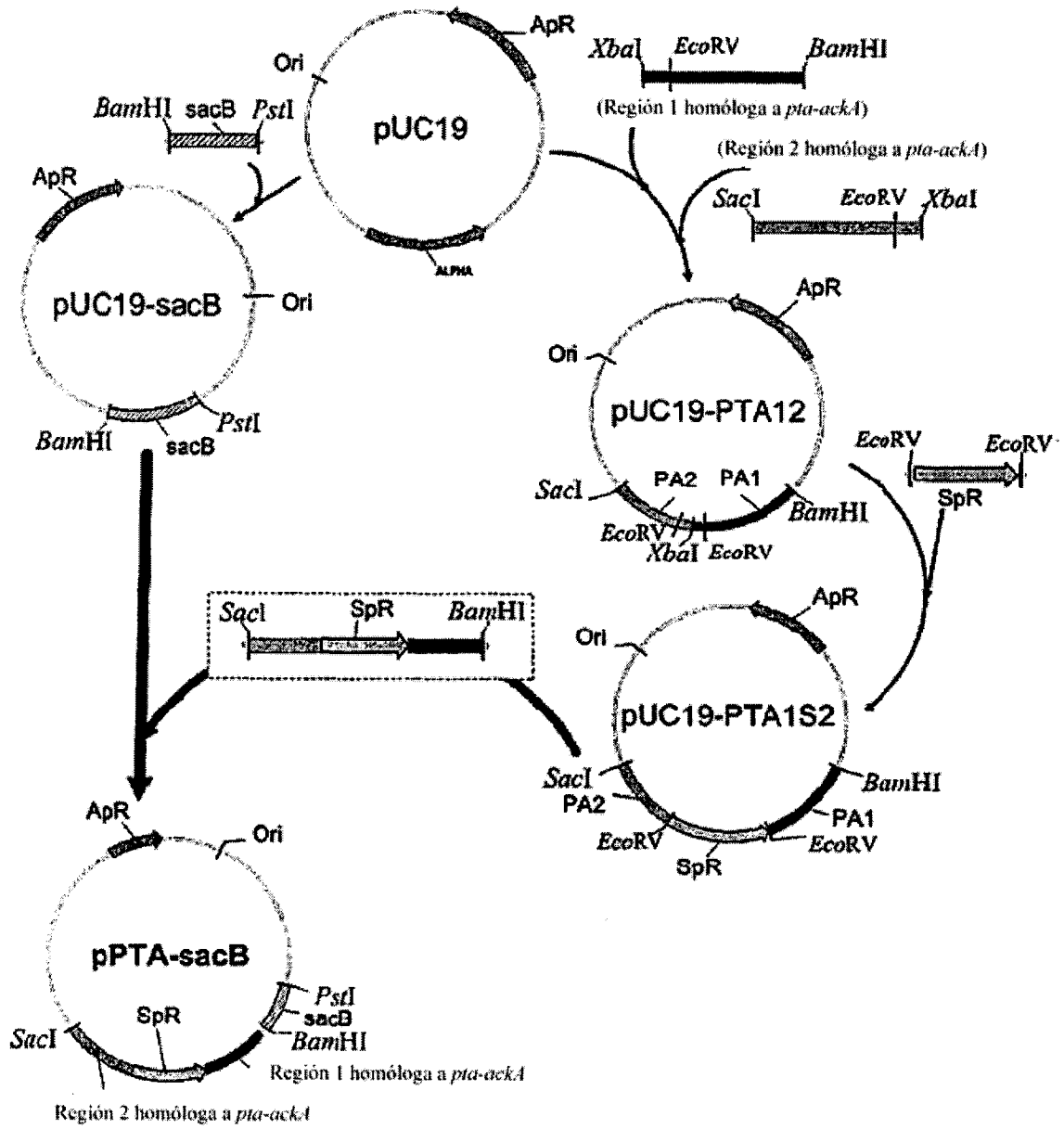


FIG. 5

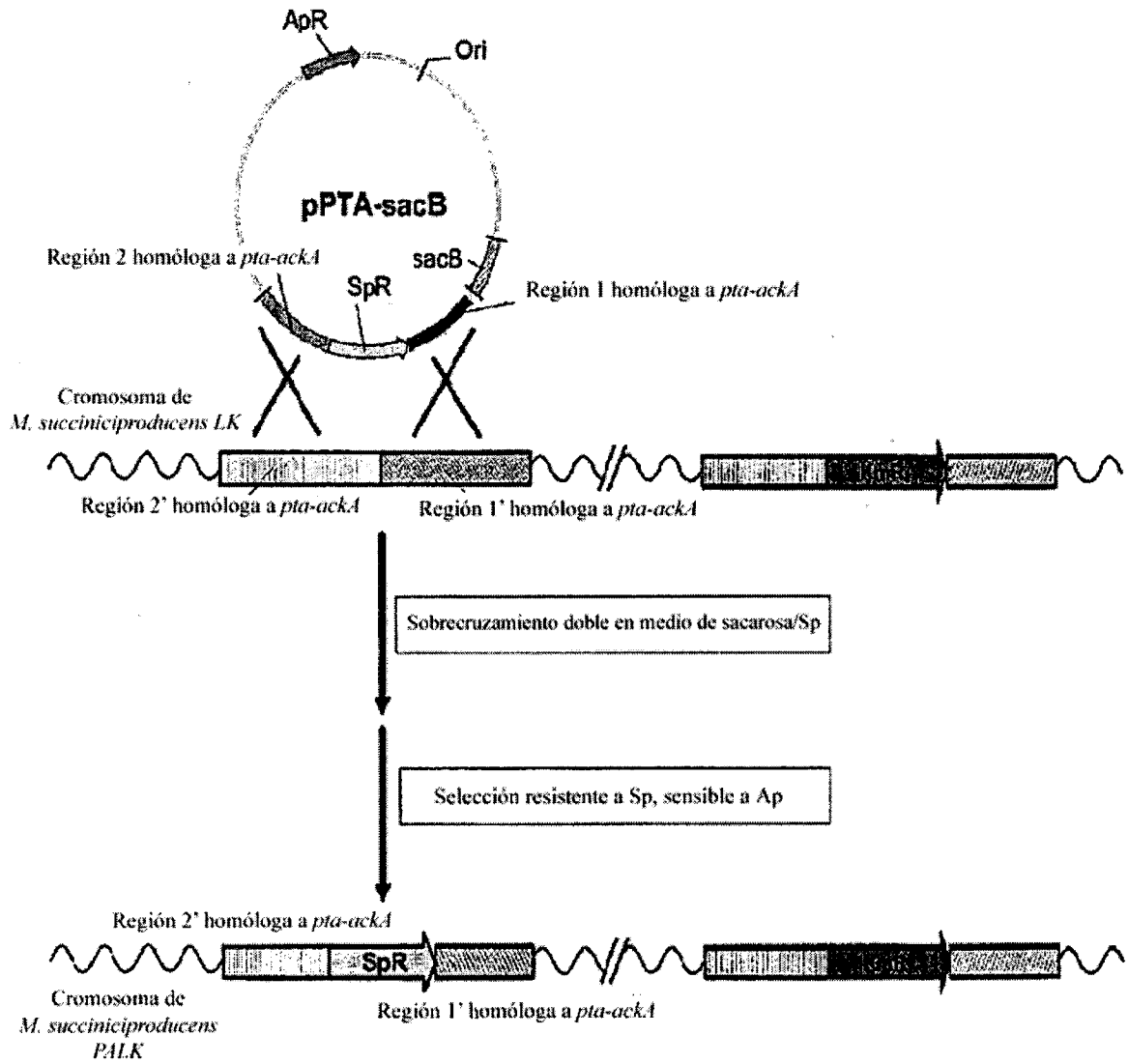


FIG. 6

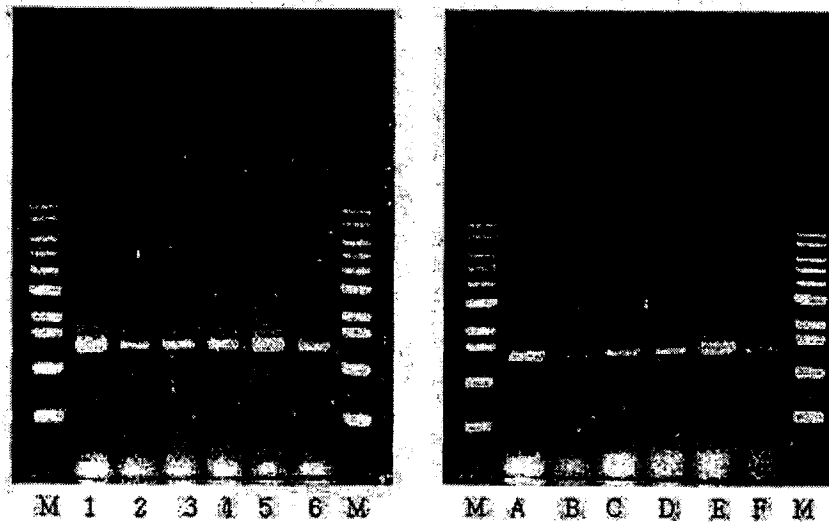


FIG. 7

