

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 512**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 15/52** (2006.01)  
**C12P 7/40** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12P 7/46** (2006.01)  
**C12R 1/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2011 E 15188336 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2993225**

54 Título: **Nuevo microorganismo mutante productor de ácido succínico que utiliza sacarosa y glicerol simultáneamente, y método para producir ácido succínico utilizando el mismo**

30 Prioridad:

**30.08.2010 KR 20100084327**

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

**14.02.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEE, SANG YUP;  
CHOI, SOL;  
YI, JONGHO y  
LEE, JEONG WOOK**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 654 512 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

Nuevo microorganismo mutante productor de ácido succínico que utiliza sacarosa y glicerol simultáneamente, y método para producir ácido succínico utilizando el mismo

## CAMPO TECNICO

5 La presente invención se refiere a un microorganismo mutante productor de ácido succínico que es capaz de utilizar simultáneamente sacarosa y glicerol como fuentes de carbono. Más particularmente, la presente invención se refiere a un microorganismo mutante productor de ácido succínico que es capaz de utilizar sacarosa y glicerol simultáneamente para la producción de ácido succínico, obteniéndose el organismo mutante al debilitar el mecanismo de represión de un catabolito de glicerol mediada por sacarosa en un microorganismo productor de  
10 ácido succínico, seleccionándose el microorganismo productor de ácido succínico de *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), *Basfia* sp., *Actinobacillus* sp., y *Anaerobiospirillum* sp.

## ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

El ácido succínico es un ácido dicarboxílico compuesto de cuatro átomos de carbono, y puede ser utilizado en diversas aplicaciones industriales. El ácido succínico se puede utilizar como un precursor de productos químicos industrialmente importantes, incluyendo el ácido adípico, 1,4-butanodiol, disuccinato de etilendiamina, ácido itacónico,  $\gamma$ -butirolactona, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, y tetrahidrofurano, y el tamaño del mercado mundial de ácido succínico, incluyendo precursores del mismo, se estima en unos 15 mil millones de dólares (McKinlay et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 76:727, 2007). Con el reciente interés en un desarrollo ambientalmente sostenible y debido a la disminución de las reservas de petróleo y las fluctuaciones de precios resultantes, se han realizado en las últimas  
15 décadas estudios mundiales sobre la producción de ácido succínico basado en productos biológicos (McKinlay et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:727, 2007; Song et al., Enzyme Microbial Technol., 39:352, 2006; Jantama et al., Biotechnol. Bioeng., 99:1140, 2008). Sin embargo, cualquier tipo de cepa desarrollada hasta la fecha no permitió maximizar la productividad y el rendimiento de ácido succínico y reducir al mínimo la producción de subproductos. Cuando la productividad era alta, la eficiencia era baja, e inversamente, cuando la eficacia era alta, la productividad era baja. Además, cuando la productividad era alta, también se produjeron grandes cantidades de subproductos. Por lo tanto, no se ha desarrollado aún una cepa ideal que pueda aumentar la productividad y el rendimiento, mientras que únicamente produzca ácido succínico (Jantama et al., Biotechnol. Bioeng., 99:1140, 2008).

La sacarosa tiene un precio de aproximadamente 1/4 del precio de la glucosa que se utiliza generalmente para producir ácido succínico por fermentación microbiana. También, con un rápido aumento de la producción mundial de biodiésel, el glicerol se produce como un subproducto, y por lo tanto el precio del mismo está disminuyendo debido a un suministro excesivo y se requiere un método adecuado para el tratamiento de glicerol. En consecuencia, el precio del glicerol es muy bajo y sigue disminuyendo (Miller-Klein Associates, Oct. 2006).

Mientras tanto, la mayoría de los microorganismos utilizan preferentemente fuentes preferidas de carbono a partir de mezclas de diferentes fuentes de carbono. Para hacerlo posible, la mayoría de los microorganismos tienen un mecanismo de represión de un catabolito que inhibe la utilización de fuentes de carbono no preferidas cuando las fuentes preferidas de carbono están disponibles (Gorke et al., Nature Reviews, 6:613, 2008). Con respecto a la utilización preferente de las fuentes de carbono regulada por un mecanismo de represión de un catabolito, es bien sabido que *E. coli* muestra crecimiento diáuxico en presencia de glucosa y lactosa, como se dio a conocer por Monod et al. en 1942. Aquí, la fuente de carbono preferida es la glucosa, y por lo tanto *E. coli* muestra una curva de crecimiento diáuxico en la que la fuente no preferida de carbono, la lactosa, empieza a ser consumida después de una fase de retardo corta después de que la glucosa ha sido completamente consumida. También, debido a este mecanismo de represión de un catabolito, es muy difícil para las cepas generales de *Mannheimia* utilizar sacarosa y glicerol al mismo tiempo. Sin embargo, la utilización de glicerol como una fuente de carbono ofrece muchas ventajas. El glicerol es altamente reducido y cuando se utiliza como una fuente de carbono, son producidos equivalentes reductores (NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub>, etc.) en una cantidad dos veces mayor que los azúcares tales como glucosa, xilosa y sacarosa durante la producción del intermedio fosfoenolpiruvato (PEP). Por lo tanto, el glicerol es una fuente de carbono atractiva para la producción de productos químicos reductores (Yazdani et al., Curr. Opin. Biotechnol., 18:213, 2007). Sin embargo, en muchos casos, la velocidad de crecimiento de las células mediante la utilización de glicerol en condiciones anaeróbicas es más lenta que con la utilización de otros azúcares, y por lo tanto la utilización de glicerol como única fuente de carbono es ventajosa en términos de potencia reductora, pero tiene una limitación en el aumento de la productividad de un producto biológico deseado, ya que muestra una velocidad lenta de crecimiento. Lee et al., Applied and Environmental Microbiology, 76(5):1699-1703, 2010, describen la cepa mutante de *Mannheimia succiniciproducens* MBEL 55E[delta]2178, en la que se ha suprimido un "gen MS2178" que codifica una fructosa PTS, es decir, fructosa fosfotransferasa (p.1703 col.1 par.2 y Tabla 1). El documento WO 2010/093150 describe un microorganismo recombinante con capacidad mejorada para el metabolismo del glicerol y una  
45 producción de ácido succínico, y un método para producir ácido succínico utilizando el mismo.

Para superar esta limitación, si la velocidad de utilización de glicerol se puede aumentar mientras se utilizan azúcares tales como sacarosa, que tienen una mayor velocidad de utilización que el glicerol y permiten el crecimiento celular en un nivel y velocidad superiores, las células pueden se pueden hacer crecer a una velocidad

alta mientras que se utiliza la ventaja del alto poder reductor del glicerol, y de este modo se pueden producir efectivamente compuestos reductores, en particular ácido succínico.

5 En consecuencia, los presentes inventores han hecho grandes esfuerzos para desarrollar un método de producción de ácido succínico de alta pureza con una alta eficiencia mediante el uso de sacarosa y glicerol baratos simultáneamente, y como resultado, han encontrado que, cuando se cultiva un microorganismo mutante productor de ácido succínico, obtenido mediante la supresión de un gen que codifica fructosa fosfotransferasa a partir de un microorganismo productor de ácido succínico o introduciendo un gen que codifica glicerol cinasa en el microorganismo, el mecanismo de represión de un catabolito en el microorganismo mutante se debilita de manera que el microorganismo mutante puede producir ácido succínico utilizando sacarosa y glicerol simultáneamente, 10 puede minimizar la producción de subproductos, y puede producir ácido homo-succínico con una alta eficiencia y una productividad muy alta que no se puede conseguir en los métodos convencionales, completando así la presente invención.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

##### PROBLEMA TÉCNICO

15 Un objeto de la presente invención es un microorganismo mutante en el que el mecanismo de represión de un catabolito se debilitó de manera que el microorganismo es capaz de utilizar simultáneamente sacarosa y glicerol para maximizar el rendimiento de la producción de ácido succínico con el fin de acercarse al nivel teórico y reducir al mínimo la producción de subproductos para producir con ello ácido homo-succínico.

20 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir ácido homo-succínico en dicho microorganismo mutante utilizando sacarosa y glicerol como fuentes de carbono en condiciones anaeróbicas, sin producir subproductos.

##### SOLUCIÓN TÉCNICA

25 Para conseguir los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un microorganismo mutante de un microorganismo productor de ácido succínico, teniendo interrumpido el microorganismo mutante un gen que codifica fructosa fosfotransferasa (*fruA*), en el que el microorganismo productor de ácido succínico se selecciona del grupo que consiste en *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), *Basfia* sp., *Actinobacillus* sp., y *Anaerobiospirillum* sp. La presente invención también proporciona un método para preparar un microorganismo mutante que es capaz de utilizar sacarosa y glicerol para la producción de ácido succínico, comprendiendo el método debilitar el mecanismo de represión de un catabolito de glicerol en un microorganismo productor de ácido 30 succínico, en el que el microorganismo productor de ácido succínico se selecciona del grupo que consiste en *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), *Basfia* sp., *Actinobacillus* sp., y *Anaerobiospirillum* sp.; y en el que el debilitamiento del mecanismo de represión de un catabolito se lleva a cabo suprimiendo un gen que codifica fructosa fosfotransferasa (*fruA*).

35 La presente invención también proporciona un método para producir ácido succínico, comprendiendo el método cultivar un microorganismo mutante productor de ácido succínico como se define anteriormente en un medio que contiene tanto sacarosa como glicerol produciendo de ese modo ácido succínico; y recuperar el ácido succínico producido a partir del caldo de cultivo.

##### BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

40 La FIG. 1 muestra esquemáticamente las rutas metabólicas de sacarosa y glicerol y el mecanismo de represión de un catabolito en una cepa de *Mannheimia*. Específicamente, la FIG. 1A muestra las rutas metabólicas generales de sacarosa y glicerol, y el mecanismo de represión de un catabolito entre las mismas, y la FIG. 1B muestra partes de la FIG. 1A, que pueden ser metabólicamente manipuladas con el fin de debilitar el mecanismo de represión de un catabolito (Gly, glicerol; G3P, glicerol 3-fosfato; SCR, sacarosa; G6P, glucosa 6-fosfato; FRU, fructosa; F1P, fructosa 1-fosfato; FBP, fructosa 1,6-bifosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; SUC, ácido succínico; PYR, ácido pirúvico; IIBCF, unidad PTS IIBC de fructosa; IIBCS, 45 unidad PTS IIBC de sacarosa; EI, enzima I; HPr, proteína de histidina; IIA, enzima IIA de PTS; Fpr, proteína IIA/HPr específica de fructosa bifuncional; AC, adenilato ciclasa; cAMP, AMP cíclico; CRP, proteína receptora de cAMP).

50 La FIG. 2 es un conjunto de gráficas que muestran el crecimiento celular y la producción de metabolitos obtenidos en el cultivo alimentado por lotes de *M. succiniciproducens* PALK (FIG. 2A), *M. succiniciproducens* PALFK (FIG. 2B) y *M. succiniciproducens* PALKG (FIG. 2C).

La FIG. 3 es una gráfica que muestra el crecimiento celular y la producción de metabolitos obtenidos en el cultivo alimentado por cultivo en una cepa de *M. succiniciproducens* PALFK inoculada en una cantidad mayor.

La FIG. 4A es una vista esquemática que muestra un método de cultivo MCRB, en el que la línea continua indica el flujo de corrientes de líquido (medio, medio que contiene células, medio que contiene metabolito, etc.), y la línea de puntos indica el flujo de gas (dióxido de carbono). La FIG. 4B es una gráfica que muestra el crecimiento celular y la producción de metabolitos obtenidos en el cultivo de una cepa de *M. succiniciproducens* PALFK, llevada a cabo por un método de cultivo MCRB.

#### MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el que es comúnmente entendido por un experto normal en la técnica a la que pertenece la invención. En general, la nomenclatura utilizada en la presente es bien conocida y se emplea comúnmente en la técnica.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo mutante de un microorganismo productor de ácido succínico, teniendo interrumpido el microorganismo mutante un gen que codifica fructosa fosfotransferasa (*fruA*), en el que el microorganismo productor de ácido succínico se selecciona del grupo que consiste en *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), *Basfia* sp., *Actinobacillus* sp., y *Anaerobiospirillum* sp.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "mecanismo de represión de un catabolito" se refiere a un mecanismo que reprime la utilización microbiana de una fuente de carbono no preferida en presencia de una fuente de carbono preferida cuando el microorganismo se cultiva en un medio en el que están presentes diversas fuentes de carbono (Gorke et al., Nature Reviews, 6:613, 2008).

En una cepa de *Mannheimia* que es una cepa productora de ácido succínico, la sacarosa y glicerol no podrían ser utilizados simultáneamente para la producción de ácido succínico por el mecanismo de represión de un catabolito.

Generalmente, cuando la sacarosa y glicerol están presentes simultáneamente, el glicerol es consumido después de que se ha consumido la sacarosa, que es una fuente de carbono preferida. También, *Mannheimia* prefiere sacarosa sobre la glucosa de modo que ésta metaboliza más rápidamente la sacarosa cuando la sacarosa y el glicerol están presentes simultáneamente.

La presente invención tiene como objetivo debilitar artificialmente este mecanismo de represión de un catabolito.

El mecanismo de represión de un catabolito puede ser principalmente dividido en dos: la represión transcripcional, y la represión alostérica (Deutscher et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70:939, 2006; Gorke et al., Nature reviews, 6:613, 2008; Pettigrew et al., J. Bacteriol., 178:2846, 1996; Zwaig et al., J. Bacteriol., 102:753, 1970). Con respecto a la represión de la transcripción, el regulador GlpR reprime la transcripción de los genes que están involucrados en el transporte intracelular y en la utilización de glicerol. Tal como se utiliza aquí, la expresión "represión alostérica" se refiere a la disminución de la actividad de glicerol cinasa causada por la unión de fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) o EIIA a la glicerol cinasa que desempeña un papel clave en el metabolismo del glicerol. En un ambiente en el que la sacarosa y el glicerol están presentes simultáneamente, la represión transcripcional por el regulador GlpR y la represión alostérica por FBP y EIIA ocurren simultáneamente, de modo que el metabolismo del glicerol es generalmente reprimido. Una estrategia capaz de debilitar este mecanismo de represión de un catabolito evita la represión transcripcional causada por GlpR y la represión alostérica causada por FBP y EIIA.

La figura 1 muestra esquemáticamente las rutas metabólicas de sacarosa y glicerol y el mecanismo de represión de un catabolito en una cepa de *Mannheimia*.

Específicamente, la FIG. 1A muestra las rutas metabólicas generales de sacarosa y glicerol, y el mecanismo de represión de un catabolito entre ellas, y la FIG. 1B muestra partes de la FIG. 1A, que pueden ser metabólicamente diseñadas con el fin de debilitar el mecanismo de represión de un catabolito. En la FIG. 1, las flechas de línea continua indican las rutas metabólicas de sacarosa y glicerol, y el grosor de las mismas indica la proporción metabólica relativa. Las flechas punteadas delgadas indican un proceso en el que se transfiere un grupo fosforilo continuamente de PEP a una unidad PTS IIBC, y las flechas punteadas gruesas muestran esquemáticamente las diversas rutas capaces de inducir la expresión del operón de *glp*, incluyendo una ruta que comienza a partir de IIA fosforilada, una ruta que comienza a partir de la adenilato ciclasa (AC), una ruta que comienza a partir de CRP-cAMP, una ruta que comienza a partir de G3P-GlpR, etc. Las líneas gruesas de puntos que tienen una forma de T en el extremo indican el grado relativo de represión alostérica causada por IIA no fosforilada y/o fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) aplicada a la glicerol cinasa (GlpK) que desempeña un papel clave en el operón de *glp*.

Como se muestra en la FIG. 1A, el mecanismo de represión de un catabolito de glicerol mediada por sacarosa se divide en gran parte en represión transcripcional por GlpR o similar, y represión alostérica por FBP y EIIA. Como se muestra en la FIG. 1B, los métodos para superar esta represión incluyen un método para superar la represión transcripcional mediante la inducción de la producción de diferentes activadores, un método para debilitar la represión alostérica mediada por GlpK por la reducción de la concentración de FBP o IIA, y similares.

Por ejemplo, hay un método en el que IIBCF se elimina de la porción 1 de la FIG. 1B de modo que la concentración de IIA fosforilada es relativamente incrementada para inducir la expresión de AC, y de este cAMP se produce mucho

- más para incrementar la producción de CRP-cAMP, induciendo con ello la expresión del operón de *glp*. G3P producido por GlpK así expresada, separa adicionalmente el represor transcripcional GlpR de los sitios de unión al ADN del regulón de GLP (*glpABC*, *glpF*, *glpK*, etc.) para facilitar la transcripción de los genes del regulón de *glp*. En este momento, la concentración de IIA no fosforilada se mantiene a un nivel relativamente bajo, y el metabolismo general de la sacarosa se reduce debido a la eliminación de IIBCF de modo que la concentración de FBP disminuye relativamente, aliviando de ese modo la represión alostérica. Los efectos simultáneos de tales dos factores dan como resultado un aumento en el metabolismo del glicerol.
- 5
- Como otro ejemplo, existe un método en el que la concentración de IIA fosforilada en la porción 2 de la FIG. 1B se incrementa para inducir la expresión de AC, y de este modo cAMP se produce mucho más para aumentar la producción de CRP-cAMP, induciendo con ello la expresión del operón de *glp*. G3P producido por GlpK así expresada, separa además el represor transcripcional GlpR de los sitios de unión al ADN del regulón de *glp* para facilitar la transcripción de los genes del regulón de *glp*, dando como resultado un aumento en el metabolismo del glicerol.
- 10
- Como otro ejemplo más, existe un método en el que la sobreexpresión de AC en la porción 3 de la FIG. 1B es inducida de manera que es producido mucho más cAMP para aumentar la producción de CRP-cAMP, induciendo con ello la expresión del operón de *glp*. G3P producido por GlpK expresada de esta manera, separa además el represor transcripcional GlpR de los sitios de unión al ADN del regulón de *glp*, para facilitar la transcripción de los genes del regulón de *glp*, dando como resultado un aumento en el metabolismo del glicerol.
- 15
- Como otro ejemplo más, existe un método en el que la sobreexpresión de la CRP en la porción 4 de la FIG. 1B y la sobreexpresión de AC en la porción 3 de la FIG. 1B son simultáneamente inducidas de modo que la producción de CRP-cAMP se incrementa, lo que induce la expresión del operón de *glp*. G3P producido por GlpK así expresada, separa además el represor transcripcional GlpR de los sitios de unión al ADN del regulón de *glp*, para facilitar la transcripción de los genes del regulón de *glp*, dando como resultado un aumento en el metabolismo del glicerol.
- 20
- Como otro ejemplo más, existe un método en el que la sobreexpresión de la CRP en la porción 4 de la FIG. 1B es inducida de manera que la producción de CRP-cAMP se incrementa, lo que induce la expresión del operón de *glp*. G3P producido por GlpK así expresada, separa además el represor transcripcional GlpR de los sitios de unión al ADN del regulón de *glp*, para facilitar la transcripción de los genes del regulón de *glp*, dando como resultado un aumento en el metabolismo del glicerol.
- 25
- Como otro ejemplo más, existe un método en el que la sobreexpresión de GlpK en la porción 5 de la FIG. 1B es inducida de manera que la producción de G3P se incrementa. Esto separa el represor transcripcional GlpR de los sitios de unión al ADN del regulón de *glp*, para facilitar la transcripción de los genes del regulón de *glp*, dando como resultado un aumento en el metabolismo de glicerol.
- 30
- Como otro ejemplo más, existe un método en el que todos los genes en el regulón de *glp* son sobreexpresados o varias combinaciones de algunos de los genes sobreexpresados, dando como resultado un aumento en el metabolismo del glicerol.
- 35
- Como otro ejemplo más, existe un método en el que un promotor de la sobreexpresión que no tiene sitio al que se pueda unir GlpR, se introduce en un sitio promotor para la expresión de cada unidad de transcripción del regulón de *glp* en el cromosoma en la porción 5 de la FIG. 1B, de modo que la represión por GlpR es fundamentalmente bloqueada y el regulón de *glp* es sobreexpresado, dando como resultado un aumento en el metabolismo del glicerol.
- 40
- Además, existe un método en el que GlpR es eliminado de modo que la represión de la expresión del regulón de *glp* es debilitada, dando como resultado un aumento en el metabolismo de glicerol.
- Como otro ejemplo más, existe un método en el que la concentración de IIA y/o FBP en las porciones 6 y 7 de la FIG. 1B se reducen de modo que el grado de represión alostérica por GlpK se reduce, dando como resultado un aumento en el metabolismo del glicerol.
- 45
- Además de los métodos arriba mencionados, existen posibles combinaciones de los métodos descritos anteriormente, y métodos aparentes de los mismos, por ejemplo, un método en el que se sobreexpresa la glicerol cinasa derivada de una cepa heteróloga diseñada para sufrir la menor represión alostérica o para sufrir represión alostérica, dando como resultado un incremento en el metabolismo de glicerol. Además, existe un método en el que se debilita el mecanismo de represión de un catabolito por lo que el metabolismo del glicerol puede ser activado.
- 50
- Mientras tanto, el ácido succínico es un ejemplo típico de esta sustancia química reductora y es un compuesto de 4 átomos de carbono que contiene dos grupos ácido carboxílico y que tiene PEP (fosfoenolpiruvato) como un precursor intermedio. También, microorganismos productores de ácido succínico se refieren a microorganismos que producen mayores cantidades de ácido succínico que otros metabolitos y pueden ser utilizados comercialmente para producir ácido succínico por fermentación. Los microorganismos productores de ácido succínico, típicos, incluyen bacterias del rumen. Las bacterias del rumen, conocidas, incluyen *Actinobacillus* sp., *Anaerobiospirillum* sp., y *Mannheimia* sp. (incluyendo *Basfia* sp. *Basfia* sp. se denominó "*Mannheimia*" cuando fue originalmente aislada, la cual se denominó "*Basfia* sp." más adelante, y la secuencia de ARNr 16S es 99,8% idéntica a la de *Mannheimia* sp.
- 55

De este modo, *Basfia* sp. también se nombra "*Mannheimia* sp." en la presente invención/ Scholten et al., documento WO2009/024294A1; Kuhnert et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60:44). De la información genética parcial (ARNr 16s), el análisis de enzimas, y los resultados de la fermentación de diversas bacterias del rumen conocidas por producir ácido succínico hasta ahora, se ha encontrado que una ruta de biosíntesis principal para la producción de ácido succínico a partir de una fuente de carbono en estas bacterias del rumen es casi idéntica con una ruta de biosíntesis para la producción de ácido succínico en *Mannheimia* sp. que es un tipo de bacteria del rumen. Especialmente todas las bacterias del rumen que están implicadas en la producción de ácido succínico convierten los compuestos de 3 átomos de carbono (fosfoenolpiruvato y piruvato) en compuesto de 4 átomos de carbono (oxaloacetato y malato) utilizando la enzima de fijación de CO<sub>2</sub> y convierten los compuestos de 4 átomos de carbono en fumarato, produciendo de este modo ácido succínico (Zeikus et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 51:545, 1999; Lee et al., Appl. Environ. Microbiol., 72:1939, 2006). En otras palabras, todas las bacterias del rumen, incluidas las *Mannheimia* sp., tienen la misma ruta para la biosíntesis de ácido succínico, y será evidente para los expertos en la técnica que la mutación genética de la presente invención se puede aplicar a las cepas productoras ácido succínico derivadas de bacterias del rumen, además de *M. succiniciproducens* mostradas en los ejemplos de la presente invención.

En la presente invención, el microorganismo productor de ácido succínico se selecciona del grupo que consiste en *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), *Basfia* sp., *Actinobacillus* sp., y *Anaerobiospirillum* sp. En la presente invención, la cepa de *Mannheimia* sp. es *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP).

En la presente invención, el debilitamiento del mecanismo de represión de un catabolito se realiza mediante la supresión de un gen que codifica la fructosa fosfotransferasa, y el microorganismo mutante puede ser *Mannheimia succiniciproducens* PALF (KCTC11694BP).

Como también se describe aquí, el debilitamiento del mecanismo de represión de un catabolito se puede realizar mediante la introducción de un gen que codifica la glicerol cinasa, y el microorganismo mutante productor de ácido succínico puede ser *Mannheimia succiniciproducens* PALFKG (KCTC11693BP).

En la presente invención, un microorganismo mutante productor de ácido succínico que produce un rendimiento máximo de ácido succínico sin producir otro ácido orgánico fue construido al manipular por ingeniería genética una bacteria del rumen, que es un microorganismo productor de ácido succínico.

En un ejemplo de la presente invención, *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) que tiene la capacidad de metabolizar la sacarosa y glicerol simultáneamente se construyó por eliminación de un gen que codifica la fructosa fosfotransferasa (*fruA*) a partir del ADN genómico de *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP). La cepa construida produce ácido succínico con un alto rendimiento y productividad sin producir subproductos.

En la presente invención, la supresión de cada uno de los genes se realizó mediante la inactivación del gen de interés utilizando un método de recombinación homologa. Sin embargo, cualquier método de ingeniería genética se puede utilizar sin limitación particular en la presente invención, siempre y cuando se pueda modificar o eliminar el gen de interés de modo que una enzima codificada por el gen de interés no se produce.

En la presente invención, el cultivo del microorganismo mutante productor de ácido succínico y la recuperación del ácido succínico se puede realizar usando cualquier método conocido en los procesos de fermentación convencionales.

En la presente invención, el rendimiento de ácido succínico, la producción de subproductos y la capacidad de metabolizar fuentes de carbono se compararon entre *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) y una cepa mutante convencional (*M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP)). *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) es un microorganismo mutante obtenido por eliminación de un gen que codifica la lactato deshidrogenasa (*ldhA*), un gen que codifica la fosfoacetilasa (*pta*) y un gen que codifica la acetato cinasa (*ackA*) a partir del genoma de una cepa de *Mannheimia* sp. y es la cepa madre del microorganismo mutante de la invención *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) en el que un gen que codifica la fructosa fosfotransferasa (*fruA*) no está suprimido.

En el microorganismo mutante productor de ácido succínico *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) de acuerdo con la presente invención, la producción de subproductos, incluyendo el ácido láctico, ácido pirúvico, ácido acético y ácido fórmico, se minimizó, y el rendimiento de la producción de ácido succínico se aumentó acercándose al rendimiento teórico (1,71-1,86 mol/mol), en comparación con los de la cepa mutante productora de ácido succínico *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC10973BP), lo que sugiere que se trata de una cepa excelente para la producción de ácido succínico.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un método para la preparación de un microorganismo mutante que es capaz de utilizar sacarosa y glicerol para la producción de ácido succínico, comprendiendo el método debilitar el mecanismo de represión de un catabolito de glicerol mediada por sacarosa, en un microorganismo productor de ácido succínico.

En otro ejemplo también descrito aquí, *M. succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP) que tiene la capacidad de metabolizar la sacarosa y el glicerol simultáneamente se construyó introduciendo un gen que codifica la glicerol cinasa de *E. coli* dentro del ADN genómico de *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP). La cepa construida produce ácido succínico con alta productividad y rendimiento sin producir subproductos.

- 5 El microorganismo productor de ácido succínico *M. succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP) se comparó también de la manera anteriormente descrita.

En todavía otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para producir ácido succínico, comprendiendo el método las etapas de: cultivar el microorganismo mutante productor de ácido succínico anterior en condiciones anaerobias; y recuperar ácido succínico a partir del caldo de cultivo.

- 10 En la presente invención, el cultivo puede llevarse a cabo en un medio que contiene sacarosa y glicerol, y la cantidad de otros ácidos orgánicos producidos como subproductos puede ser de 1% en peso o menos, basado en la cantidad de ácido succínico producido.

- 15 En todavía otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para producir ácido succínico con mayor productividad, comprendiendo el método las etapas de: (a) cultivar en condiciones anaerobias un microorganismo mutante que produce ácido succínico con un rendimiento elevado a la vez que produce poco o ningún subproducto, o un microorganismo mutante obtenido debilitando el mecanismo de represión de un catabolito de glicerol mediado por sacarosa, para ser capaces de utilizar sacarosa y glicerol simultáneamente; (b) concentrar células del microorganismo en el caldo de cultivo hasta una concentración elevada; (c) cultivar las células de concentración elevada; y (d) recuperar ácido succínico del caldo de cultivo.

- 20 En la presente invención, la etapa (b) de concentrar las células en el caldo de cultivo hasta una concentración elevada se puede llevar a cabo mediante un método de inóculo de inoculación de una concentración elevada de la cepa productora, o un método de biorreactor de reciclaje de células de membrana (MCRB) (en lo sucesivo denominado "método de MCRB").

- 25 Según el método para producir ácido succínico usando el microorganismo mutante de la invención que puede utilizar sacarosa y glicerol simultáneamente para la producción de ácido succínico, el ácido succínico puede ser producido sin subproductos con un rendimiento ultra-alto que se aproxima al rendimiento teórico. Además, la sacarosa tiene un precio de aproximadamente 1/4 del precio de la glucosa que se utiliza generalmente para producir ácido succínico por fermentación microbiana. También, con un rápido aumento de la producción mundial de biodiésel, el glicerol se produce como un subproducto, y por lo tanto el precio del mismo está disminuyendo debido a un suministro excesivo y se requiere un método adecuado para el tratamiento del glicerol. En consecuencia, el precio del glicerol es muy bajo y sigue disminuyendo (Miller-Klein Associates, Oct. 2006). El método para producir ácido succínico de acuerdo con la presente invención es muy valioso, ya que puede producir de forma rentable ácido succínico por fermentación microbiana, no un método químico sintético que requiere enormes costes de materias primas, produce ácido succínico con un rendimiento ultra-alto acercándose al rendimiento teórico, y produce ácido succínico con una pureza ultra-alta de modo que los costes de separación y purificación se pueden minimizar.

- 35 El uso de la cepa PALFK de acuerdo con la presente invención permite que el ácido homo-succínico sea producido sin subproductos con un rendimiento muy alto que se aproxima al rendimiento teórico (1,1 a 1,86 mol/mol). Tres factores, como la productividad, el rendimiento y la proporción subproductos/ácido succínico, son los factores más importantes en la industrialización de un proceso de producción de ácido succínico. Específicamente, la productividad asociada con el coste de capital inicial y el precio de la energía, y el rendimiento es una medida para el uso eficaz de las materias primas y está asociado con el coste de materia prima que ocupa una parte significativa del coste de un bio-proceso, y la proporción subproductos/ácido succínico está asociada con el coste de separación y de purificación que ocupa la mitad o más del coste total de un bio-proceso.

- 40 Así, en un ejemplo de la presente invención, utilizando la cepa PALFK, el rendimiento se maximiza y la proporción subproductos/ácido succínico se redujo al mínimo, por lo que dos de los mencionados tres factores clave (rendimiento y proporción subproductos/ácido succínico) se mejoraron a los más altos niveles alcanzables. Además, se hicieron extensos esfuerzos para encontrar un método para mejorar la productividad, y como resultado, se encontró que el método de inóculo y el método MCRB aumentan la concentración de células en un caldo de cultivo y mejoran la productividad del ácido succínico por lo menos 2 veces y 10 veces, respectivamente, que la cepa progenitora.

## EJEMPLOS

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Será obvio para una persona con experiencia ordinaria en la técnica que estos ejemplos son sólo para efectos ilustrativos y no han de interpretarse para limitar el alcance de la presente invención.

- 55 En particular, los siguientes ejemplos ilustran solamente un vector específico y *Mannheimia* sp. que es un microorganismo productor de ácido succínico como una célula hospedante con el fin de eliminar los genes de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, será obvio para una persona experta en la técnica que el uso de

otros tipos de microorganismos productores de ácido succínico también puede proporcionar microorganismos mutantes que producen ácido succínico de alta pureza.

#### Ejemplo 1: Construcción del vector suprimido en *fruA* (pSacHR06*fruA*)

5 Con el fin de eliminar el gen *fruA* (gen que codifica la fructosa fosfotransferasa) del genoma de un microorganismo productor de ácido succínico por recombinación homóloga, se construyó un vector de intercambio de genes de la siguiente manera. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el ADN genómico de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP) como plantilla y cada uno de un par de cebadores de las SEQ ID NOS: 1 y 2, un par de cebadores de las SEQ ID NOS: 3 y 4 y un par de cebadores de las SEQ ID NOS: 5 y 6, obteniéndose de este modo  
10 fragmentos de PCR que contienen una región homóloga izquierda de *fruA* (HL), un gen de resistencia al cloranfenicol (Cm) y una región homóloga derecha de *fruA* (HR), respectivamente.

Entonces, la PCR de superposición se realizó usando los tres fragmentos de PCR como una plantilla y los cebadores de las SEQ ID NOS: 1 y 6, y el fragmento de ADN resultante se digirió con SacI y PstI y se introdujo en un vector pSacHR06, construyendo de ese modo un vector pSacHR06*fruA*.

SEQ ID NO: 1: 5'-ATCGCGGATCCGGTGGAAACCCTCGGTTTATT

15 SEQ ID NO: 2: 5'-AATCTGCTCTGATGCGCAGCTAAAACCTGGTGCAATA

SEQ ID NO: 3: 5'-CCAGGTTTTAGCTGCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAG

SEQ ID NO: 4: 5'-AATTACACTTCAAACCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC

SEQ ID NO: 5: 5'-ATCCACAGAATCAGGGTTTCAAGTGAATTGGCGGAG

SEQ ID NO: 6: 5'-TCGACGCGTCTGACTTCATCTAACCCCAACGCTTG

#### 20 Ejemplo 2: Construcción de la cepa *M. succiniciproducens* PALFK

Una cepa mutante se construyó mediante la supresión de *fruA* del genoma de *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) utilizando el vector pSacHR06*fruA* para eliminar el gen de *fruA*, construido en el Ejemplo 1.

Específicamente, *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) se cultivó en medio sólido BHI (Infusión de Cerebro-Corazón) y se cultivó a 39°C durante 36 horas. La colonia formada se inoculó en 10 ml de medio líquido BHI y se  
25 cultivó durante 12 horas. El caldo de cultivo celular suficientemente desarrollado se inoculó en 100 ml de medio BHI líquido a una concentración de 1% y se cultivó en una incubadora estacionaria a 39°C.

Cuando el caldo de cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,3-0,5 después de aproximadamente 4-5 horas, se mantuvo a 0-4°C durante 20 minutos de forma que las células ya no se desarrollaran. A continuación, el caldo de cultivo se centrifugó a 4°C a 4.500 rpm durante 15 minutos para recoger las células. A continuación, las células se  
30 resuspendieron en 200 ml de disolución de glicerol al 10% a 4°C y se centrifugaron en las condiciones anteriormente descritas. Esta resuspensión y centrifugación se realizaron un total de tres veces, mientras que se redujo el volumen de la disolución de glicerol al 10% por 1/2 para cada tiempo. Las células resultantes se resuspendieron en el mismo volumen de disolución de glicerol al 10%, se repartieron y se guardaron a -80°C.

La suspensión de concentrado de células obtenido como se ha descrito anteriormente se mezcló con el vector de supresión génica pSacHR06*fruA* construido en el Ejemplo 1 y se sometió a electroporación en las condiciones de 2,5 kV, 25 µF y 200 ohmios para transformar *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) con el vector. Las células sometidas a electroporación se añadieron al medio líquido BHI y se incubaron en una incubadora estacionaria a 39°C durante 1 hora. A continuación, el caldo de cultivo se sembró en medio BHI sólido que contenía 6,8 µg/ml de antibiótico cloranfenicol y se incubó en una incubadora estacionaria a 39°C durante 48 horas o más.  
40 Con el fin de seleccionar una colonia donde se ha producido el cruzamiento doble, las colonias formadas se sembraron en medio BHI sólido que contenía cloranfenicol (6,8 µg/ml) y 100 g/l de sacarosa y se cultivaron durante 24 horas, después de lo cual las colonias formadas se sembraron de nuevo en el mismo medio.

La cepa mutante formada en el medio se cultivó en un medio líquido BHI que contiene antibiótico, y el ADN genómico se aisló de la cepa cultivada por el método de Rochelle et al (Rochelle et al., FEMS Microbiol. Lett., 100:59, 1992). Se realizó la PCR utilizando el ADN genómico aislado de la cepa mutante como una plantilla, y el producto de la PCR se sometió a electroforesis para confirmar si el gen *fruA* se ha suprimido del ADN genómico. Si el gen *fruA* ha sido o no suprimido esto fue confirmado mediante la realización de PCR dos veces de la siguiente manera. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el ADN genómico de la cepa mutante como una plantilla y cada uno de un par de cebadores de las SEQ ID NOS: 7 y 8 y un par de cebadores de las SEQ ID NOS: 9 y 10. Los  
50 fragmentos de PCR de las dos PCR se sometieron a electroforesis para confirmar la eliminación del gen *fruA* por su tamaño. Como resultado, *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) fue construido y depositado bajo el número de acceso KCTC11694BP en la Colección Coreana para Cultivos de Especies, Instituto Coreano de Investigación de Biociencia y Biotecnología.



SEQ ID NO: 7: 5'-CTATGATTTGGTCGGGCGTTT

SEQ ID NO: 8: 5'-TGAATGGCAGAAATTCGAAA

SEQ ID NO: 9: 5'-TGATCTTCCGTCACAGGTAT

SEQ ID NO: 10: 5''TTGACCGCACTTTGCACATC

**5 Ejemplo 3: Construcción del vector pME18glpK22 y construcción de la cepa de *M. succiniciproducens* PALKG introducida con el vector**

Con el fin de obtener un ADN que contenga un gen que codifica la glicerol cinasa de *E. coli* (*glpK22*), se realizó la PCR utilizando el ADN genómico de *Escherichia coli* K-12 MG1655 (ATCC 47076; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) y cada uno de un par de cebadores de las SEQ ID NOS: 11 y 12, un par de cebadores de las SEQ ID NOS: 13 y 14 y un par de cebadores de las SEQ ID NOS: 15 y 16. A continuación, se realizó la PCR utilizando los tres productos de PCR resultantes como una plantilla. El producto de PCR contenía el gen *glpK22* en el que el 913° par de bases de la secuencia de codificación tiene guanina convertida en adenosina del gen *glpK* de la *E. coli* K-12 MG1655 original. Se sabe que la glicerol cinasa que se expresa a partir del gen *glpK* sufre menos represión alostérica provocada por FBP y IIA que *glpK* no mutado. (Pettigrew et al., J. Bacteriol., 178:2846, 1996).

15 SEQ ID NO: 11: 5'-ACTCCGGAATTCAACGCACTGACAATCTCACTT

SEQ ID NO: 12: 5'-CAGCGAAGCTTTTTGGGTAGAAAGTATAAAGACAGAATCACA

SEQ ID NO: 13: 5'-TTTATACTTTCTACCCAAAAAGCTTCGCTGTAATATG

SEQ ID NO: 14: 5'-CCATAAACACCGCACTTTCCAACGCATAGTTCCTTC

SEQ ID NO: 15: 5'-AACTATGCGTTGGAAAGTGCGGTGTTTATGGCAGG

20 SEQ ID NO: 16: 5'-ACCTGCGAGCTCATTATTGATGTGTGCGGGGT

El producto de PCR obtenido como se ha descrito anteriormente se clonó en los sitios EcoRI y SacI de pME18 (Jang et al., Appl. Environ. Microbiol., 73:5411, 2007), construyendo de ese modo un vector pME18glpK22. Además, el vector se secuenció usando cebadores de las SEQ ID NOS: 17 a 21 por Solgent (Corea).

SEQ ID NO: 17: 5'-TAGCTATGTGTTAAAGCCTT

25 SEQ ID NO: 18: 5'-ACCAGGGCACCACCAGCTCC

SEQ ID NO: 19: 5'-CCGATTACACCAACGCCTCT

SEQ ID NO: 20: 5'-ATGTGGTTCGGCATTACC

SEQ ID NO: 21: 5'-TTATGCCGCATCCGGTAGTCCC

30 El vector pME18glpK22, construido como se describe anteriormente se introdujo en *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) para construir una cepa de *M. succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP). Con el fin de introducir el vector de expresión, la preparación y la electroporación de una suspensión de concentrado de células se realizó como se describe en el Ejemplo 2, y las células se sembraron en medio BHI sólido que contiene 25 µg/ml de ampicilina en lugar de cloranfenicol y se cultivaron en una incubadora estacionaria a 39°C durante 48 horas. La colonia pura formada se cultivó en medio BHI líquido durante 8 horas, y luego se mezcló con la disolución de glicerol a una concentración final de 15% (p/v), después de lo cual la disolución de células se almacenó a -80°C hasta su uso.

**Ejemplo 4: Producción de ácido homo-succínico utilizando la cepa *M. succiniciproducens* PALFK y la cepa PALFK**

40 La cepa *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) o PALKG (KCTC11693BP) construida en los Ejemplos 2 y 3 se cultivó en 10 ml de medio MH5 (por litro, 2,5 g de extracto de levadura, 2,5 g de polipeptona, 1 g de NaCl, 0,02 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,2 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 8,7 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 10,0 g de NaHCO<sub>3</sub>) que contiene 10 g/l de sacarosa y se cultivó en condiciones anaerobias a 39°C durante 8 horas. Entonces, la cepa se cultivó en 300 ml del mismo medio. Para la fermentación, el caldo de cultivo se inoculó en un reactor microbiano (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA) que contenía 2,5 litros de medio sintético (por litro, 1 g de NaCl, 2 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,02 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,2 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 8,709 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de cisteína, 0,5 g de metionina, 0,5 g de alanina, 0,5 g de asparagina, 0,5 g ácido aspártico, 2,46 g de prolina, 0,5 g de serina, 0,005 g de ácido nicotínico, 0,005 g de Ca-pantotenato, 0,005 g de piridoxina HCl, 0,005 g de tiamina, 0,005 g de ácido ascórbico y 0,005 g de biotina). La fermentación se realizó bajo las condiciones de concentración inicial de sacarosa de 22,25 g/l (65 mM), concentración inicial de glicerol de 4,6 g/l (50 mM), temperatura de 39°C y 200 rpm mientras que el dióxido de

5 carbono puro se introducía en el reactor a una velocidad de 0,2 vvm (volumen de dióxido de carbono/volumen de trabajo de la incubadora/min.). Durante la fermentación, el caldo de cultivo se ajustó a un pH de 6,5 con agua amoniacal, y se añadieron los siguientes antibióticos: 50 µg/ml de espectinomicina para PALK, 6,8 µg/ml de cloranfenicol para PALFK, y 25 µg/ml de ampicilina para PALKG. Para la producción de ácido succínico de alta concentración, cuando las fuentes de carbono se consumieron completamente, se añadieron 700 g/l de disolución de sacarosa y glicerol semi-continuamente al caldo de cultivo. Para comparación con el rendimiento de PALFK, *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) que es una cepa productora de ácido succínico, se cultivó de la misma manera como se describió anteriormente. La concentración de células en el caldo de cultivo se midió con un espectrofotómetro y se calculó utilizando la absorbancia medida previamente del espectrofotómetro y un ensayo de verificación de peso de células secas. Durante la fermentación, se recolectaron muestras del biorreactor regularmente. Las muestras recolectadas se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos y, a continuación las concentraciones de los distintos metabolitos, ácido succínico, sacarosa y glicerol en los sobrenadantes se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

15 Como resultado, como se muestra en la FIG. 2 y en la Tabla 1, *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) mostró un mayor rendimiento de la producción de ácido succínico que *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) y produjo ácido succínico de alta pureza sin producir subproductos. La absorción de glicerol que muestra el mismo grado de reducción que el ácido succínico se incrementó aproximadamente 7 veces, y esta absorción de glicerol está relacionada directamente con la producción de cantidades reducidas de subproductos, ya que no está mediada la producción de piruvato que está relacionada directamente con la producción de subproductos, a diferencia de cuando se usa sacarosa. Además, el aumento de la absorción de glicerol permite que sea utilizada una cantidad reducida de sacarosa, por lo que el ácido homo-succínico se produce con un alto rendimiento utilizando menores cantidades de fuentes de carbono.

25 También, *M. succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP) mostró un patrón ligeramente diferente de la cepa PALFK, en que la utilización de glicerol en la cepa PALKG se aumentó en el intervalo que no deterioró la utilización de sacarosa y el crecimiento celular, y por lo tanto la acumulación de piruvato se mantuvo en el nivel igual al de la cepa PALK. Sin embargo, la capacidad de la cepa PALKG para utilizar glicerol fue al menos dos veces mayor que la de la cepa PALK, y como resultado, la cepa PALKG produjo ácido succínico con un rendimiento de 1,39 mol/mol, que fue mayor que aquel de la cepa PALK (1,24 mol/mol).

Tabla 1: Características del cultivo de cepas de *Mannheimia*

| Cepa                         | PALK  | PALFK | PALKG |
|------------------------------|-------|-------|-------|
| Sacarosa (g/l)               | 77,88 | 39,80 | 61,87 |
| Glicerol (g/l)               | 5,52  | 29,75 | 11,84 |
| Ácido succínico (g/l)        | 65,05 | 68,41 | 64,67 |
| Ácido pirúvico (g/l)         | 8,00  | 0     | 7,70  |
| Ácido acético (g/l)          | 1,43  | 1,03  | 0,62  |
| Subproductos totales (g/l)   | 9,44  | 1,03  | 8,32  |
| Subproductos/ácido succínico | 0,15  | 0,02  | 0,13  |
| Rendimiento (mol/mol)        | 1,24  | 1,57  | 1,39  |

\* Los valores para la sacarosa y glicerol son los valores expresados como absorción, y los valores para el ácido succínico, el ácido pirúvico y el ácido acético son las cantidades de los ácidos producidos. El rendimiento es un valor obtenido mediante el cálculo de los contenidos de la sacarosa y el glicerol basado en equivalentes de glucosa.

\*\* Cada uno de los valores para la sacarosa y el glicerol, la cantidad producida y el rendimiento es el promedio de tres experimentos independientes.

30 Ejemplo 5: Mejora de la productividad del ácido succínico de la cepa *M. succiniciproducens* PALFK que produce altos rendimientos de ácido homo-succínico

En este Ejemplo, se examinó un método para mejorar la productividad de ácido succínico de la cepa *M. succiniciproducens* PALFK que produce un alto rendimiento de ácido homo-succínico.

35 Como puede verse en la FIG. 2B, la cepa PALFK alcanzó la más alta productividad en 13-15 horas después de la inoculación, y la concentración celular fue la más alta en ese momento. Por lo tanto, con el fin de maximizar la

productividad de ácido succínico, se examinó el cambio en la productividad resultante de un incremento en la concentración celular.

Con el fin de examinar el cambio en la productividad del ácido succínico, que resulta cuando la concentración inicial de células de PALFK bajo las condiciones de cultivo como se describe en el Ejemplo 4 se aumentó a  $DO_{600} = 9,03$ , fue realizado el siguiente experimento. Como se describe en el Ejemplo 4, la fermentación se realizó en un reactor microbiano (Bioflo 3000) que contiene 5 litros de medio MH5 que contiene 22,25 g/l de sacarosa y 10 g/l de glicerol en las condiciones de temperatura de 39°C y 200 rpm mientras que el dióxido de carbono puro fue alimentado en el medio a una velocidad de 0,2 vvm (volumen de dióxido de carbono/volumen de trabajo de la incubadora/minuto). Durante la fermentación, el caldo de cultivo se ajustó a un pH de 6,5 mediante la adición de agua amoniacal, y se añadió al medio 6,8 µg/ml del antibiótico cloranfenicol. La concentración de células de la cepa PALFK alcanzó una  $DO_{600}$  de aproximadamente 4,6, el proceso de cultivo se detuvo, y el caldo de cultivo se centrifugó a temperatura ambiente a 6000 rpm durante 10 minutos para recoger peletes celulares. Los peletes de células recogidos se resuspendieron en 300 ml de medio MH5 para obtener una alta concentración de un inóculo, que se inoculó a continuación, y se cultivó en medio sintético en las condiciones descritas en el Ejemplo 4. Como resultado, como se puede ver en la FIG. 3 y en la Tabla 2, la productividad del ácido succínico fue de 6,03 g/l/h (la más alta productividad: 10,69 g/l/h) que fue al menos dos veces mayor que aquella en las condiciones originales, y el grado de producción de subproducto y el rendimiento del ácido succínico fueron casi similares a aquellos en las condiciones originales.

Basándose en estos resultados, con el fin de aumentar artificialmente la concentración celular, se utilizó un sistema de biorreactor de reciclaje de células de membrana (MCRB) (FIG. 4A).

En el sistema MCRB, una unidad de membrana de fibra hueca (CellFlo Plus Module; Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) para el reciclaje de células se conectó a un reactor Bioflo 110 (New Brunswick Scientific Co.), y el volumen de trabajo del biorreactor se mantuvo a 0,4 l. La velocidad de agitación en el biorreactor se mantuvo a 100 rpm, y se hizo funcionar una bomba de diafragma para el reciclaje celular a una velocidad de 150 ml/min.

La composición del medio sintético fue la misma que se utilizó en el Ejemplo 4, excepto que contenía 0,5 g/l de prolina. En el biorreactor, la concentración inicial de sacarosa fue 22,25 g/l, y la concentración de glicerol inicial fue de 4,6 g/l, y en el tanque de alimentación, se utilizó 30 g/l de sacarosa y 21 g/l de glicerol. Durante la operación de MCRB, la velocidad de dilución (D) se mantuvo a  $1,027 \text{ h}^{-1}$ , y la velocidad de resudado celular que determina el crecimiento celular en un estado normal se mantuvo a  $0,015 \text{ h}^{-1}$ . Durante la operación de MCRB, se analizó una muestra por lo menos cinco veces a intervalos más largos que el tiempo de recambio mínimo (que se refiere al tiempo para alcanzar el volumen de trabajo como una función de la velocidad de dilución (D) durante el cultivo; en  $D = 1$  o  $2$ , el tiempo para alcanzar el volumen de trabajo es de 1 h y 0,2 h) para determinar la concentración de células, la producción de metabolitos, el consumo de fuentes de carbono, y similares, y el estado en el que estas mediciones se mantuvieron a niveles constantes fue definido como el estado normal.

Los resultados del cultivo realizado en MCRB como se describe anteriormente se muestran en la FIG. 4B y en la Tabla 2. Como se puede ver allí, la productividad del ácido succínico de la cepa PALFK fue 29,73 g/l/h, que fue al menos 10 veces mayor que la de la cepa progenitora. Además, el rendimiento de ácido succínico se mantuvo en el mismo nivel, y la producción de subproductos fue ligeramente mayor que aquella en el Ejemplo 4, pero se mantuvo a un nivel bajo. En conclusión, como se muestra en este Ejemplo, los presentes inventores tuvieron éxito en la producción de ácido succínico con una productividad ultra-alta de 29,73 g/l/h con una alta eficiencia (1,54 mol/mol) que se aproxima al rendimiento teórico por el uso de la estrategia de aumentar la productividad después de maximizar el rendimiento y la disminución en la producción de subproductos. La productividad del ácido succínico mostrada en este Ejemplo es una productividad ultra-alta que aún no ha sido alcanzada por ningún método convencional, y tiene una gran significancia ya que se alcanzó mientras que fue alcanzado el rendimiento que se aproximaba al rendimiento teórico de 1,54 mol/mol.

Tabla 2: Características del cultivo de la cepa PALFK en diversos métodos de fermentación

| Tipo de fermentación       | Lote alimentado | Lote alimentado' | MCRB  |
|----------------------------|-----------------|------------------|-------|
| Sacarosa (g/l)             | 39,80           | 53,08            | 19,71 |
| Glicerol (g/l)             | 29,75           | 26,89            | 8,11  |
| Ácido succínico (g/l)      | 68,41           | 78,41            | 29,00 |
| Ácido pirúvico (g/l)       | 0               | 1,64             | 3,86  |
| Ácido acético (g/l)        | 1,03            | 0,72             | 0,81  |
| Subproductos totales (g/l) | 1,03            | 2,36             | 4,27  |

## ES 2 654 512 T3

|   |      |       |       |
|---|------|-------|-------|
| Subproductos/ácido succínico  | 0,02 | 0,03  | 0,15  |
| Rendimiento (mol/mol)   | 1,57 | 1,64  | 1,54  |
| Productividad máxima (g/l/h)  | 2,46 | 6,03  | 29,73 |
| Productividad global (g/l/h)  | 4,55 | 10,69 | 29,73 |
| <p>* Lote alimentado' indica un lote alimentado inoculado con una alta concentración de células (<math>DO_{600} = 9,03</math> inmediatamente después de la inoculación inicial) durante la fermentación por lote alimentado.</p> <p>** Los datos para la fermentación por lote alimentado son la media de tres experimentos independientes, y los datos para MCRB son el promedio de cinco muestras consecutivas recogidas después de que ha sido alcanzado el estado normal.</p> |      |       |       |

### [Depósito de Microorganismos]

Institución Depositaria: Instituto Coreano de Investigación de Biociencia y Biotecnología;

Número de acceso: KCTC 11693BP;

5 Fecha de depósito: 10 de mayo de 2010.

Institución Depositaria: Instituto Coreano de Investigación de Biociencia y Biotecnología;

Número de acceso: KCTC 11694BP;

Fecha de depósito: 10 de mayo de 2010.

### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

10 Como se ha descrito anteriormente, cuando se cultiva el microorganismo mutante productor de ácido succínico, utiliza sacarosa y glicerol simultáneamente de modo que el ácido succínico se puede producir con alta productividad con un rendimiento máximo que se aproxima al rendimiento teórico, mientras que la producción de subproductos se reduce al mínimo. Además, de acuerdo con la presente invención, diversos productos químicos reducidos, que se han producido en bajos rendimientos en los métodos convencionales pueden ser más eficazmente producidos.

15 Aunque la presente invención se ha descrito con detalle con referencia a las características específicas, será manifiesto para los expertos en la técnica que esta descripción es solamente para una realización preferida, y no limita el alcance de la presente invención. De este modo, el alcance sustancial de la presente invención se definirá mediante las reivindicaciones anejas y sus equivalentes.

<110> Korea advanced Institute of Science and Technology

20 <120> Nuevo microorganismo mutante productor de ácido succínico que usa simultáneamente sacarosa y glicerol, y método para preparar ácido succínico utilizando el mismo

<130> 25330EP1

<140>

<141> 2011-08-30

25 <150> KR10-2010-0084327

<151> 2010-08-30

<160> 21

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

30 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador  
 <400> 1  
 atcgcggatc cggtggaac cctcggtta tt 32  
 5 <210> 2  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> cebador  
 <400> 2  
 aatctgctct gatgcgcagc taaaacctgg tgcaata 37  
 <210> 3  
 <211> 40  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 3  
 20 ccaggtttta gctgcgcac agagcagatt gtactgagag 40  
 <210> 4  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 4  
 aattacactt gaaaccctga ttctgtggat aaccgtatta c 41  
 <210> 5  
 30 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 35 <400> 5  
 atccacagaa tcagggttc aagtgaatt ggcggag 37  
 <210> 6

<211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> cebador  
 <400> 6  
 tcgacgcgtc gacttcacatc aacccaacg ctg 34  
 <210> 7  
 <211> 21  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 7  
 15 ctatgatttg gtcgggcgtt t 21  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 8  
 tgaatggcag aaattcgaaa 20  
 <210> 9  
 25 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 9  
 tgatcttccg tcacaggtat 20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador

<400> 10  
 ttgaccgcac ttgcacatc 20  
 <210> 11  
 <211> 33  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 11  
 10 actccggaat tcaacgcact gacaatctca ctt 33  
 <210> 12  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 12  
 cagcgaagct tttgggtag aaagtataaa gacagaatca ca 42  
 <210> 13  
 20 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 25 <400> 13  
 tttatacttt ctacccaaaa agcttcgctg taatatg 37  
 <210> 14  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 14  
 ccataaacac cgcactttcc aacgcatagt tcacttc 37  
 35 <210> 15  
 <211> 35  
 <212> ADN

# ES 2 654 512 T3

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador  
<400> 15  
5 aactatgcgt tggaaagtc ggtgttatg gcagg 35  
<210> 16  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10 <220>  
<223> cebador  
<400> 16  
acctgcgagc tcattattga tgtgtcgagg gt 32  
<210> 17  
15 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador  
20 <400> 17  
tagctatgtg ttaaagcctt 20  
<210> 18  
<211> 20  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador  
<400> 18  
accagggcac caccagctcc 20  
30 <210> 19  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
35 <223> cebador  
<400> 19  
ccgattacac caacgcctct 20



# ES 2 654 512 T3

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 20

atgtggttcc ggcattacc 20

<210> 21

10 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

15 <400> 21

ttatgccgca tccgtagtc cc 22

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un microorganismo mutante de un microorganismo productor de ácido succínico, teniendo interrumpido el microorganismo mutante un gen que codifica fructosa fosfotransferasa (*fruA*), en el que el microorganismo productor de ácido succínico se selecciona del grupo que consiste en *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), *Basfia* sp., *Actinobacillus* sp., y *Anaerobiospirillum* sp.
2. El microorganismo mutante de la reivindicación 1, en el que al microorganismo mutante se le ha introducido un gen que codifica glicerol cinasa derivado de *E. coli*.
3. El microorganismo mutante de la reivindicación 1, en el que el microorganismo mutante es *Mannheimia succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP).
- 10 4. El microorganismo mutante de la reivindicación 1, en el que el microorganismo mutante es *Mannheimia succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP).
5. El microorganismo mutante de la reivindicación 1, en el que el microorganismo mutante utiliza glicerol y sacarosa simultáneamente como fuente de carbono para producir el ácido succínico.
- 15 6. El microorganismo mutante según la reivindicación 1, en el que el microorganismo mutante se obtiene debilitando un mecanismo de represión de un catabolito de glicerol mediado por sacarosa en el microorganismo productor de ácido succínico.
7. Un método para preparar un microorganismo mutante que es capaz de utilizar sacarosa y glicerol para la producción de ácido succínico,  
comprendiendo el método debilitar el mecanismo de represión de un catabolito de glicerol en un microorganismo  
20 productor de ácido succínico, en el que el microorganismo productor de ácido succínico se selecciona del grupo que consiste en *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), *Basfia* sp., *Actinobacillus* sp., y *Anaerobiospirillum* sp.,  
y en el que el debilitamiento del mecanismo de represión de un catabolito se lleva a cabo suprimiendo un gen que codifica fructosa fosfotransferasa (*fruA*).
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en el que el microorganismo mutante es *Mannheimia succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP).
9. El método de la reivindicación 7, en el que el microorganismo mutante es *Mannheimia succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP).
- 30 10. Un método para producir ácido succínico, comprendiendo el método:  
cultivar un microorganismo mutante productor de ácido succínico de la reivindicación 1 en un medio que contiene tanto sacarosa como glicerol produciendo de ese modo ácido succínico;  
y recuperar ácido succínico producido a partir del caldo de cultivo.

FIG. 1

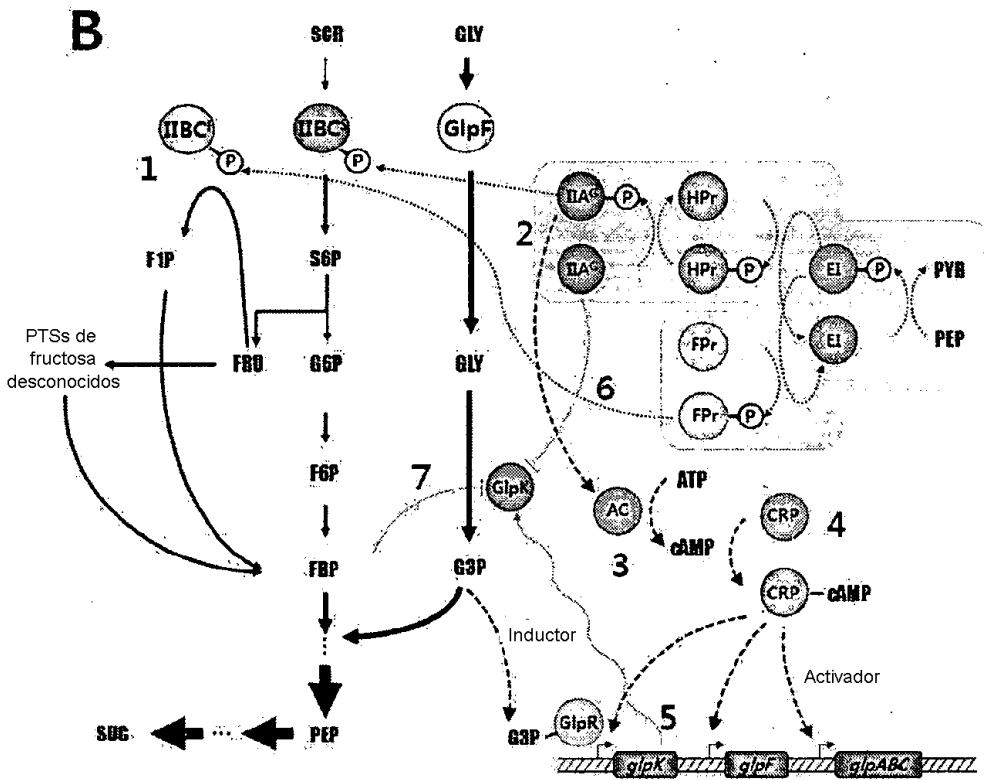
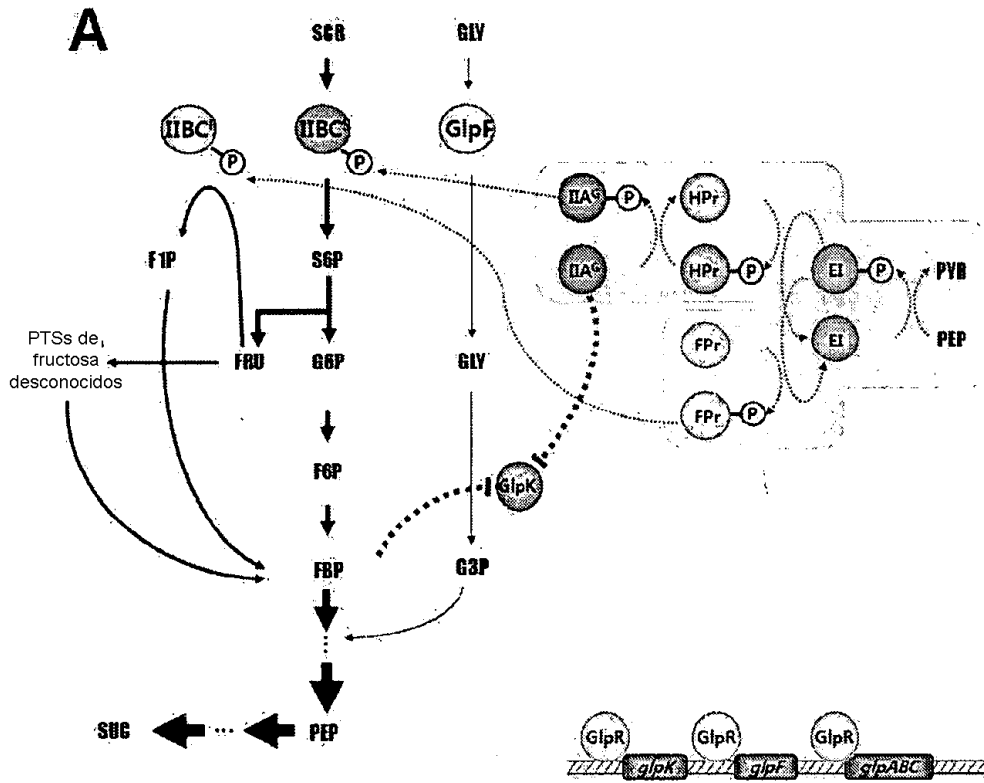


FIG. 2

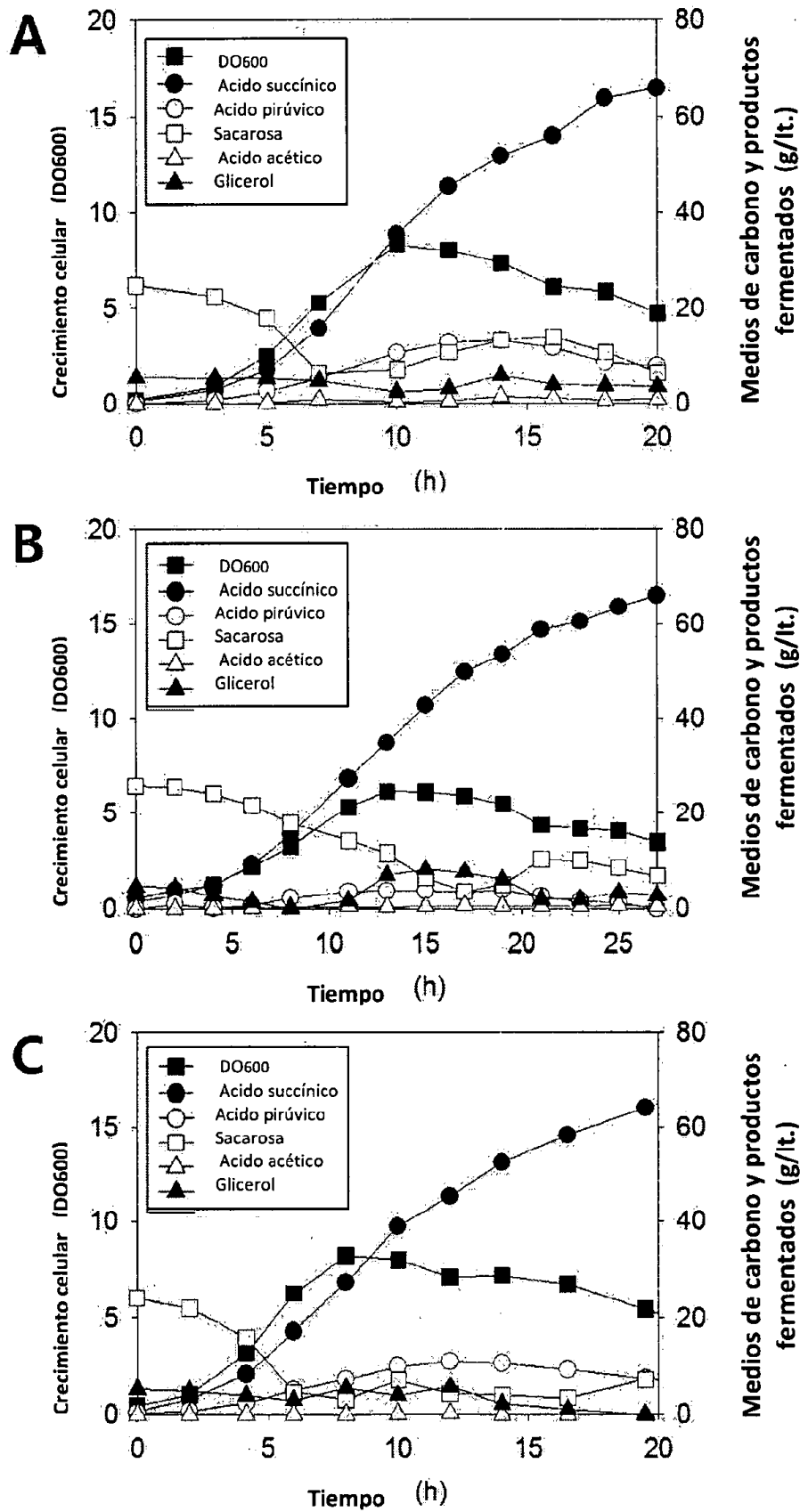


FIG. 3

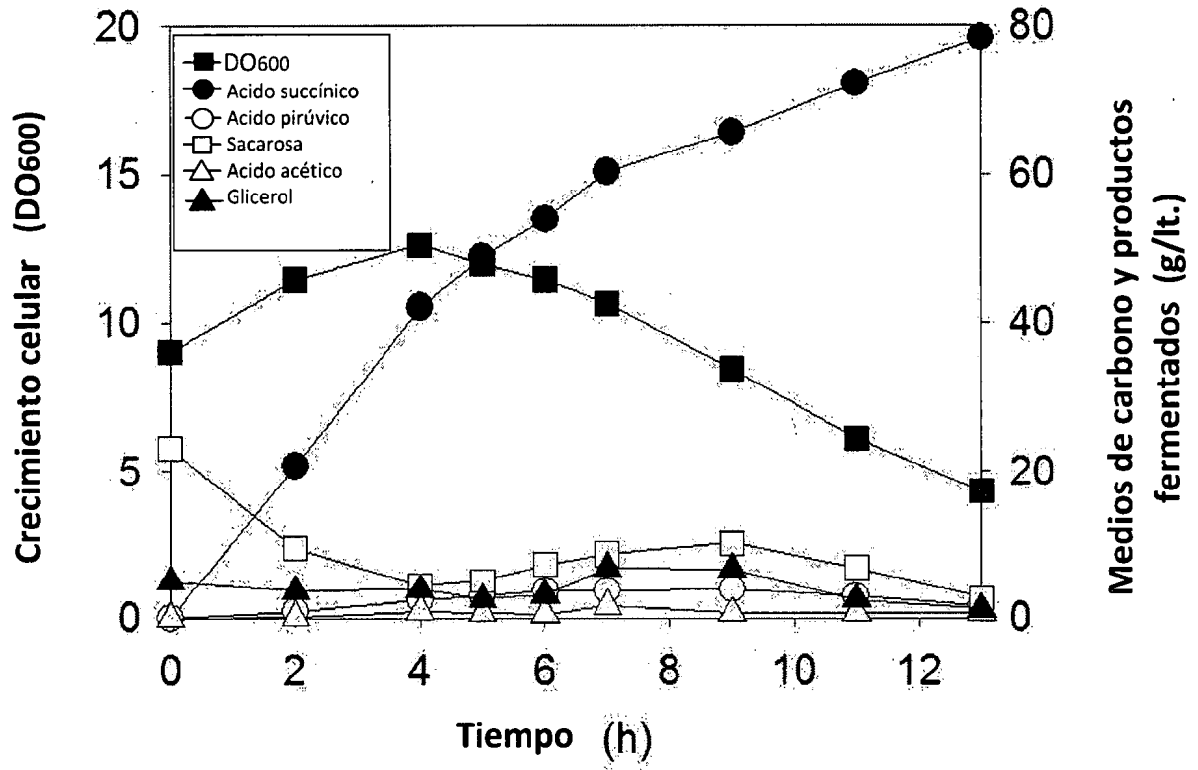


FIG. 4

