

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 153**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014 PCT/KR2014/001920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14148754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 14769402 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2977444**

54 Título: **Microorganismo recombinante con productividad aumentada de 2,3-butanodiol y método para producir 2,3-butanodiol que lo utiliza**

30 Prioridad:

18.03.2013 KR 20130028884

26.09.2013 KR 20130114791

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

05.06.2018

73 Titular/es:

GS CALTEX CORPORATION (100.0%)

**Yeoksam-dong 508 Nonhyeon-ro Gangnam-gu
Seoul 135-985, KR**

72 Inventor/es:

PARK, JONG-MYOUNG;

SONG, HYO-HAK y

YANG, TAEK-HO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 671 153 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 recombinante con productividad aumentada de 2,3-butanodiol y método para producir 2,3-butanodiol que lo utiliza

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante que tiene capacidad mejorada de producir 2,3-butanodiol y a un método para producir 2,3-butanodiol que lo utiliza, en donde el microorganismo es *Klebsiella*.

[Antecedentes de la técnica]

2,3-butanodiol ($\text{CH}_3\text{CHOHCHOHCH}_3$), que es uno de los alcoholes que tiene cuatro carbonos y dos grupos hidroxilos (-OH), es capaz de convertirse en un catalizador químico con 1,3-Butadieno que es una materia prima utilizada en un proceso de fabricación de caucho sintético y metil etil cetona (MEK) utilizados como un aditivo de combustible y un disolvente (Ji et al., *Biotechnol. Adv.*, 29: 351, 2011). Además, 2,3-butanodiol se aplica como un potenciador de octano mediante la mezcla con gasolina, que es un intermediario significativamente importante en las industrias de combustible (Celinska et al., *Biotechnol. Adv.*, 27: 715, 2009).

2,3-butanodiol es capaz de producirse mediante un proceso de síntesis química y un proceso de fermentación microbiana. Sin embargo, puesto que el coste de producción de 2,3-butanodiol a través de los procesos descritos anteriormente es significativamente alto, la producción a escala industrial de 2,3-butanodiol no se logra. Entretanto, de acuerdo con un aumento rápido en el precio de materias primas fósiles y el refuerzo de la regulación sobre contaminación ambiental internacional, junto con el reciente y rápido desarrollo de una tecnología de producción de 2,3-butanodiol a través de un proceso de fermentación de microorganismos, ha aumentado la importancia del interés en la producción de 2,3-butanodiol de origen biológico a través de la fermentación de microorganismos y su investigación y desarrollo.

Un método para producir el 2,3-butanodiol de origen biológico es convertir biomasa renovable en 2,3-butanodiol a través de fermentación de microorganismos que tienen capacidad de producir 2,3-butanodiol. Se produce 2,3-butanodiol mediante varios tipos de microorganismos tales como especie *Klebsiella*, especie *Enterobacter*, especie *Bacillus*, especie *Serratia* y similares (Maddox IS, *Biotechnol.*, 6: 269, 1996). En particular, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) y *Paenibacillus polymyxa* producen una cantidad relativamente grande de 2,3-butanodiol. En particular, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) y *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) tienen ventajas en que el cultivo se realiza fácilmente, la tasa de crecimiento es rápida y el 2,3-butanodiol es capaz de producirse a partir de varios tipos de biomasas incluyendo pentosa derivada de material lignocelulósico (Ji et al., *Biotechnol. Adv.*, 29: 351, 2011; Chandel et al., *Sustainable Biotechnol.*, 63, 2010; Jansen et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 362, 1984; Jansen et al., *Adv. Biochem. Eng.*, 27: 85, 1983).

La investigación sobre producción del 2,3-butanodiol de origen biológico a través del proceso de fermentación de microorganismos se ha realizado de acuerdo con dos campos divididos en un campo de optimización del proceso de fermentación (temperatura, pH, oxígeno disuelto y similares) y un campo de desarrollo de microorganismos (descubrimiento de microorganismos, comprensión de características fisiológicas, mutación, ingeniería genética y similares). En el campo de optimización del proceso de fermentación, se identificaron diversas condiciones tales como temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto y similares para producir eficazmente 2,3-butanodiol (Ji et al., *Bioresour. Technol.*, 100: 3410, 2009; Nakashimada et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 90: 661, 2000; Nakashimada et al., *Biotechnol. Lett.*, 20: 1133, 1998). Sin embargo, la producción de 2,3-butanodiol a través del proceso de fermentación de microorganismos en las condiciones descritas anteriormente todavía tiene dificultades para aplicarse directamente a procesos comerciales debido a un rendimiento y productividad bajos. Además, la producción tiene una desventaja en que también se producen diversos subproductos tales como ácidos orgánicos incluyendo ácido láctico, alcoholes incluyendo etanol y similares, junto con 2,3-butanodiol en el proceso de fermentación. La aparición de subproductos reduce el rendimiento de 2,3-butanodiol para biomasa y requiere enormes costes para la separación y purificación en un proceso de recuperación de 2,3-butanodiol de un fluido de cultivo.

Por consiguiente, la investigación sobre el desarrollo de microorganismos asociados con la producción de 2,3-butanodiol ha progresado principalmente por la reducción de subproductos. Como un método representativo, Ji et al., consiguieron éxito mediante la inhibición parcial de la aparición de ácidos orgánicos que son subproductos, mediante la exposición a UV de una cepa silvestre de *Klebsiella oxytoca* como uno de los métodos de mutagénesis química física (Ji et al., *Biotechnol. Lett.*, 30: 731, 2008). Además, existe un intento para mejorar la producción de 2,3-butanodiol mediante la aplicación de un método de inyección de iones (haz de iones) a una cepa de *Klebsiella pneumoniae* para aumentar la velocidad de consumo de biomasa (Ma et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82: 49, 2009). Sin embargo, las cepas anteriormente desarrolladas son todavía insuficientes para aplicarse directamente a procesos comerciales en vistas de productividad, concentración final y rendimiento de 2,3-butanodiol.

Por lo tanto, los presentes inventores estudiaron un microorganismo recombinante que no solo tiene alta productividad, alta concentración y alto rendimiento de 2,3-butanodiol, sino también que tiene alta selectividad de 2,3-butanodiol, que genera menos subproductos y encontraron que un microorganismo recombinante del cual se eliminan genes específicos tiene una pequeña cantidad de subproductos mientras que, simultáneamente, tiene alta selectividad y alta productividad de 2,3-butanodiol y, por consiguiente, completaron la presente invención.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo recombinante que tiene capacidad mejorada de producir 2,3-butanodiol y un método para producir 2,3-butanodiol que utiliza el mismo, en donde el microorganismo es Klebsiella.

[Solución Técnica]

Para alcanzar el objetivo de la presente invención, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención, se proporciona un microorganismo recombinante que tiene capacidad mejorada de producir 2,3-butanodiol, en donde se inhibe una ruta para convertir piruvato en acetil-CoA, una ruta para convertir piruvato en ácido fórmico y una ruta para convertir piruvato en lactato en un microorganismo que tiene rutas biosintéticas de acetil-CoA y lactato, en donde el microorganismo es Klebsiella.

De acuerdo con otra realización ilustrativa de la presente invención, se proporciona un método para producir 2,3-butanodiol, incluyendo el método:

cultivar el microorganismo recombinante como se describe anteriormente; y recuperar 2,3-butanodiol del microorganismo recombinante cultivado.

[Efectos ventajosos]

El microorganismo recombinante de acuerdo con la presente invención puede producir 2,3-butanodiol con alta selectividad y concentración.

[Descripción de los dibujos]

La Fig. 1 es un diagrama que ilustra una ruta en la que 2,3-butanodiol se sintetiza en una cepa de Klebsiella.
 La Fig. 2 es una imagen de gel de agarosa obtenida mediante amplificación por PCR y electroforesis para confirmar que se elimina *ldhA*, que es un gen de lactato deshidrogenasa asociado con la aparición de ácido láctico.
 La Fig. 3 es una imagen de gel de agarosa obtenida mediante amplificación por PCR y electroforesis para confirmar que se elimina *pflB*, que es un gen de piruvato-formiato liasa asociado con la aparición de formiato.
 La Fig. 4 ilustra resultados de la fermentación de una cepa de Klebsiella oxytoca del Ejemplo comparativo 1.
 La Fig. 5 ilustra resultados de la fermentación de una cepa de Klebsiella oxytoca recombinante del Ejemplo comparativo 2.
 La Fig. 6 ilustra resultados de la fermentación de una cepa de Klebsiella oxytoca recombinante del Ejemplo 1.
 Las figuras 7 a 11 ilustran resultados de la fermentación discontinua de una cepa de Klebsiella oxytoca recombinante del Ejemplo 1 que depende de una velocidad de agitación de 150 rpm (Fig. 7), 250 rpm (Fig. 8), 350 rpm (Fig. 9) y 450 rpm (Fig. 10) (Fig. 11: concentraciones de 2,3-butanodiol por hora dependiendo de la velocidad de agitación).
 La Fig. 12 ilustra resultados de la fermentación discontinua alimentada de una cepa de Klebsiella oxytoca recombinante del Ejemplo 1 realizada mediante la retención de la velocidad de agitación de 450 rpm en condiciones aerobias.
 La Fig. 13 ilustra resultados de la fermentación discontinua alimentada de una cepa de Klebsiella oxytoca recombinante del Ejemplo 1 realizada mediante el control de la agitación

[DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS]

La presente invención se refiere a:

un microorganismo recombinante que tiene capacidad mejorada de producir 2,3-butanodiol, en donde se inhibe una ruta para convertir piruvato en acetil-CoA, una ruta para convertir piruvato en ácido fórmico y una ruta para convertir piruvato en lactato en un microorganismo que tiene rutas biosintéticas de acetil-CoA y lactato, en donde el microorganismo es Klebsiella.

Además, la presente invención se refiere a:

un método para producir 2,3-butanodiol, incluyendo el método: cultivar el microorganismo recombinante de la presente invención; y recuperar 2,3-butanodiol del microorganismo recombinante cultivado.

5 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe con detalle.

Microorganismo recombinante que tiene capacidad mejorada de producir 2,3-butanodiol

10 El microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante que tiene capacidad mejorada de producir 2,3-butanodiol, en donde se inhibe la ruta para convertir piruvato en acetil-CoA, la ruta para convertir piruvato en ácido fórmico y la ruta para convertir piruvato en lactato en un microorganismo que tiene rutas biosintéticas de acetil-CoA y lactato, en donde el microorganismo es Klebsiella.

15 Además, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante a partir del cual no se elimina un gen que codifica la enzima de deshidrogenación de alcoholes (aldehído/alcohol deshidrogenasa), es decir, adhE.

20 Preferentemente, como se ilustra en la Fig. 1, el microorganismo recombinante de la presente invención es un microorganismo recombinante en el que se inhibe la ruta para convertir piruvato en acetil-CoA, la ruta para convertir piruvato en ácido fórmico o la ruta para convertir piruvato en lactato mientras que tiene rutas biosintéticas de acetil-CoA y lactato.

25 Además, el microorganismo recombinante de la presente invención tiene alta selectividad, rendimiento, concentración y productividad de 2,3-butanodiol. Es decir, en el microorganismo recombinante de la presente invención, la selectividad de 2,3-butanodiol es del 70 % o más, preferentemente, 80 % o más y el rendimiento de 2,3-butanodiol es 0,35 g/g o más basándose en cultivo discontinuo o cultivo discontinuo alimentado. Además, debido a la recombinación, el microorganismo recombinante de la presente invención inhibe mejor la capacidad de producir ácido fórmico, ácido acético o etanol en comparación con un microorganismo silvestre.

30 Ruta biosintética de acetil-CoA

Una ruta biosintética de acetil-CoA acuerdo con la presente invención significa una ruta en la que se sintetiza acetil-CoA a partir de un metabolito específico en un microorganismo. La ruta biosintética de acetil-CoA de acuerdo con la presente invención es una ruta para sintetizar acetil-CoA a partir de piruvato y similares.

Ruta biosintética de lactato

40 Una ruta biosintética de lactato de acuerdo con la presente invención significa una ruta en la que se sintetiza lactato a partir de un metabolito específico en un microorganismo. La ruta biosintética de lactato de acuerdo con la presente invención es una ruta para sintetizar lactato a partir de piruvato y similares.

Microorganismo que tiene rutas biosintéticas de acetil-CoA y lactato

45 Los microorganismos de la presente invención se incluyen en el género Klebsiella, preferentemente, Klebsiella oxytoca (K. oxytoca), Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae) y similares y el más preferentemente, Klebsiella oxytoca (K. oxytoca).

Inhibición de la ruta para convertir piruvato en acetil-CoA

50 La piruvato-formiato liasa controla la conversión de piruvato en acetil-CoA. Una ruta para convertir piruvato en acetil-CoA puede inhibirse mediante la inhibición de la piruvato-formiato liasa. La inhibición de la piruvato-formiato liasa puede lograrse mediante la inhibición de la expresión de la piruvato-formiato liasa, la inhibición de la actividad enzimática de la piruvato-formiato liasa y similares. Por ejemplo, la piruvato-formiato liasa puede inhibirse mediante la selección de métodos apropiados por un experto en la técnica, los métodos apropiados tales como delección de pflB que es un gen que codifica la piruvato-formiato liasa, desarrollo de mutantes en el gen (un mutante que inhibe la expresión de un gen normal mediante la mutación, sustitución o delección parcial de bases del gen o mediante la introducción parcial de bases en el gen), regulación de la expresión de genes en un proceso de transcripción o un proceso de traducción y similares.

60 Inhibición de la ruta para convertir piruvato en ácido fórmico

65 La piruvato-formiato liasa controla la conversión de piruvato en ácido fórmico. Una ruta para convertir piruvato en ácido fórmico puede inhibirse mediante la inhibición de la piruvato-formiato liasa. La inhibición de la piruvato-formiato liasa puede lograrse mediante la inhibición de la expresión de la piruvato-formiato liasa, la inhibición de la actividad enzimática de la piruvato-formiato liasa y similares. Por ejemplo, la piruvato-formiato liasa puede inhibirse mediante

la selección de métodos apropiados por un experto en la técnica, los métodos apropiados tales como delección de pflB que es un gen que codifica la piruvato-formiato liasa, desarrollo de mutantes en el gen (un mutante que inhibe la expresión de un gen normal mediante la mutación, sustitución o delección parcial de bases del gen o mediante la introducción parcial de bases en el gen), regulación de la expresión de genes en un proceso de transcripción o un proceso de traducción y similares.

Inhibición de la ruta para convertir piruvato en lactato

La lactato deshidrogenasa controla la conversión de piruvato en lactato. Una ruta para convertir piruvato en lactato puede inhibirse mediante la inhibición de la lactato deshidrogenasa. La inhibición de la lactato deshidrogenasa puede lograrse mediante la inhibición de la expresión de la lactato deshidrogenasa, la inhibición de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa y similares. Por ejemplo, la lactato deshidrogenasa puede inhibirse mediante la selección de métodos apropiados por el experto en la técnica, los métodos apropiados tales como delección de ldhA que es un gen que codifica la lactato deshidrogenasa, desarrollo de mutantes en el gen (un mutante que inhibe la expresión de un gen normal mediante la mutación, sustitución o delección parcial de bases del gen o mediante la introducción parcial de bases en el gen), regulación de la expresión de genes en un proceso de transcripción o un proceso de traducción y similares.

Enzima de deshidrogenación de alcoholes

Una enzima de deshidrogenación de alcoholes (aldehído/alcohol deshidrogenasa) controla una ruta para convertir acetil-CoA en etanol. Por consiguiente, existe un caso de promoción de un aumento de la producción de 2,3-butanodiol mediante la delección de adhE que es un gen que codifica la enzima de deshidrogenación de alcoholes para inhibir la aparición de etanol (Ji et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 85: 1751, 2010). Sin embargo, en el microorganismo recombinante de la presente invención, cuando adhE se elimina adicionalmente, la cantidad de producción, selectividad y productividad de 2,3-butanodiol disminuye significativamente. Por consiguiente, adhE que es un gen que codifica la enzima de deshidrogenación de alcoholes no se elimina en la presente invención.

Método para producir 2,3-butanodiol

Un método para producir 2,3-butanodiol de la presente invención incluye cultivar el microorganismo recombinante de la presente invención; y recuperar 2,3-butanodiol del microorganismo recombinante cultivado.

Se realiza el cultivo en condiciones aerobias, preferentemente, condiciones microaerobias. Por ejemplo, se realiza el cultivo mientras se suministra oxígeno, es decir, aire durante el cultivo y, específicamente, el suministro del oxígeno puede realizarse mediante agitación. Preferentemente, se realiza el cultivo mientras se agita a una velocidad de agitación de 450 rpm o menos, más preferentemente, 50 a 450 rpm y, todavía más preferentemente, 150 a 450 rpm.

Preferentemente, el cultivo puede controlar la productividad de 2,3-butanodiol mediante el control de una cantidad de suministro de oxígeno. Como un método para controlar la cantidad de suministro de oxígeno durante el cultivo, por ejemplo, el cultivo de la presente invención puede realizarse mientras se agita y el cultivo puede controlar la productividad de 2,3-butanodiol mediante el control de la velocidad de agitación durante el cultivo. Por ejemplo, cuando aumenta la concentración de acetoína a 5 g/l o más, preferentemente, 10 g/l o más, la velocidad de agitación puede disminuir, lo que aumenta la concentración y productividad de 2,3-butanodiol e inhibe la aparición de subproductos.

[Mejor modo]

Diversas ventajas y características de la presente invención y métodos que la llevan a cabo serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones con referencia a los dibujos adjuntos. Sin embargo, la presente invención no se limita a la realización ilustrativa divulgada en el presente documento sino que se implementará de diversas formas. Las realizaciones ilustrativas se proporcionan a modo de ejemplo solamente de forma que un experto familiarizado con la técnica pueda comprender completamente las descripciones de la presente invención y el alcance de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención se definirá solamente mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Material y método

Concentración (g/l) de -2,3-butanodiol: Cantidad de 2,3-butanodiol para producirse por unidad de volumen

Rendimiento (g/g) de -2,3-butanodiol: Cantidad de producción (g) de 2,3-butanodiol / fuente de carbono (g) × 100

Productividad (g/l/h) de -2,3-butanodiol: Cantidad de 2,3-butanodiol para producirse por unidad de tiempo y unidad de volumen

Selectividad (%) de 2,3-butanodiol: Cantidad de producción (g) de 2,3-butanodiol / (cantidades de producción (g) de 2,3-butanodiol, etanol, acetoína, ácido succínico, formiato de lactato y ácido acético) × 100

<Ejemplo experimental 1> Producción de microorganismo recombinante

5 Para inactivar un gen diana de *Klebsiella oxytoca* producido con un fragmento de ADN que incluye una región homóloga del gen diana, se utilizó un mecanismo recombinante de bacterias y se amplificó mediante PCR la región homóloga del gen a eliminar. Después, se transfirió el fragmento de ADN correspondiente que incluye la región homóloga a las bacterias y, luego, se eliminó el gen diana mediante el mecanismo recombinante por recombinasa entre la región homóloga del gen en el fragmento de ADN y un gen en el cromosoma de *Klebsiella oxytoca*.

10 En primer lugar, para realizar la clonación de lactato deshidrogenasa de *Klebsiella oxytoca*, se amplificó una región homóloga 1 (SEQ ID NO: 2) de *ldhA* (SEQ ID NO: 1), que es un gen diana, con cebadores de SEQ ID NO: 3 y 4 mediante PCR. Además, se amplificó una región homóloga 2 (SEQ ID NO: 5) del mismo con cebadores de SEQ ID NO: 6 y 7 mediante PCR. Después, se utilizaron simultáneamente las dos regiones homólogas 1 y 2 como un molde y se amplificaron mediante PCR, completando así un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 8) que incluye las regiones homólogas 1 y 2.

15 Entretanto, para realizar la clonación de una región homóloga de la piruvato-formiato liasa de *Klebsiella oxytoca*, se amplificó una región homóloga 1 (SEQ ID NO: 10) de *pfIB* (SEQ ID NO: 9), que es un gen diana, con cebadores de SEQ ID NO: 11 y 12 mediante PCR. Además, se amplificó una región homóloga 2 (SEQ ID NO: 13) del mismo con cebadores de SEQ ID NO: 14 y 15 mediante PCR. Después, se utilizaron simultáneamente las dos regiones homólogas 1 y 2 como un molde y se amplificaron mediante PCR, completando así un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 16) que incluye las regiones homólogas 1 y 2 (Tabla 1). Para aumentar la probabilidad de recombinación del
20 gen diana, el fragmento de ADN completado puede incluir un gen de resistencia antibiótica y similares. Además, el fragmento de ADN puede incluir un gen *sacB* que codifica una enzima levansacarasa, para eliminar el gen de resistencia antibiótica recombinante en el cromosoma.

[Tabla 1]

SEQ ID NO.	SECUENCIAS
1	ATGAAAATCGCTGTGTATAGTACAAAACAGTACGACAAGAAGTATCTGCAGCATGTTAATGATG CATATGGCTTTGAACTGGAGTTTTTTGACTTCCTGCTAACCAGAAAAACCGCCAAAACCGCCA ACGGCTGTGAAGCGGTGTGTATCTTCGTAAACGATGACGGTAGCCGCCGGTACTTGAAGAA CTGAAAGCCCCACGGCGTGCAGTACATCGCGCTGCGCTGCGCGGGGTTCAACAACGTTGACC TCGATGCCGCCAAAAGAGCTGGGCCTGCCGGTGGTGC CGTCCCGGCCACTCGCCGGAAG CGGTCGCTGAGCACGCGATCGGCATGATGATGTCGCTGAACCGCCGCATTACCGTGCCTA TCAGCGCACCCGCGACGCGAACTTCTCTCTGGAAGGGCTGACCGGTTTCACCATGCACGGT AAAACCGCCGGCGTTATTGGCACCGGTAAAATCGGCGTCGCCGCGCTGCGCATTCTTAAAG GCTTCGGTATGCGTCTGCTGGCGTTTGATCCCTACCCAGCGCCGCCGCGCTGGATATGGG CGTGGAGTATGTCGATCTTGAACCCTGTACCGGGAGTCCGATGTTATCTCACTGCACTGCC CACTGACCGATGAAAACCTACCATTTGCTGAACCATGCCGCGTTGATCGCATGAAAGACGGG GTGATGATCATCAACACCAGCCGCGCGCGCTCATCGATTCCGAGGCAGCGATCGACGCC TGAAGCATCAGAAAATTGGCGCGCTGGGGATGGACGTGTATGAGAACGAACCGCATCTGTTT TTTGAAGATAAGTCTAATGACGTGATTCAGGATGATGTGTTCCGCGCTCTCCGCGCTGCCAT AACGTCCTGTTTACCGGTCACCAGGCGTTTCTGACCGCGGAAGCGTTGATCAGCATTTCGCA AACCAACCTCGACAACCTGCGTCAAGTGGATGCAGGCGAAACCTGTCTAACGCACCTGGTCT GA
2	ATGACGTTGCTAAATCCTGCGCCGTCATCTCGCTGCTGATCCCGGGCACCTCCGGGCTACT GCTGTTCCGGCACCCCTGGCATCGGCCAGCCCGGGACATTTCTGTTAATGTGGATGAGCGCC AGCCTCGGCGCTATCGGCGGATTCTGGCTCTCGTGGCTGACGGGCTACCGCTACCGGTACC ATCTGCATCGTATCCGCTGGCTTAATGCCGAACGCCTCGCTCGCGGCCAGTTGTTCTCGCG CGCCACGGCGCGTGGGCAGTCTTTTTAGCCGCTTCTCTCTCCGCTTCGCGCCACCGTGC CGCTGGTAACCGGCGCCAGCGGCACCTCTCTCTGGCAGTTTCAGCTCGCCAACGTCAGCTC CGGGCTGCTCTGGCCGCTGATCCTGCTGGCGCCAGGCGGTTAAGCCTCAGCTTTTGATGA

ES 2 671 153 T3

	AAGGTATTGCTCTTTAAAGAGATTTCTTAACACCGCGATATGCTCTAGAATTACTATAACCT GCTGATTAAGTAGTTTTAACATTTGTAAGATTATTTAATTATGCTACCGTGACGGTATTATCA CTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGCCCTTTTGTGC
3	Ko_ldhA_FP1 - CACGGATCCATGACGTTTCGCTAAATCCTGC
4	Ko_ldhA_RP1 - GCACAAAAGGGCAAGGAAAAAAGACTTTTTCTCCAGTGATA
5	TATCACTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGCCCTTTTGTGCTCCCCCTTGC GGGGGGCACATT CAGATAATCCCCACAGAAATTGCCTGCGATAAAGTTACAATCCCTTCATTTATTAACGATAA ATATTTATGGAGATTAATGAACAAGTATGCTGCGCTGCTGGCGGTGGGAATGTTGCTATCGG GCTGCGTTTTATAACAGCAAGGTGTCGACCAGAGCGGAACAGCTTCAGCACCACCGTTTTGTG CTGACCAGCGTTAACGGGCAGCCGCTGAATGCCGCGGATAAGCCGCAGGAGCTGAGCTTC GGCGAAAAGATGCCATTACGGGCAAGATGTCTGTTTCAGGTAATATGTGCAACCGCTTCAG CGGCACGGGCAAAGTCTCTGACGGCGAGCTGAAGGTTGAAGAGCTGGCAATGACCCGCATG CTCTGCACGGACTCGCAGCTTAACGCCCTGGACGCCACGCTGAGCAAAATGCTGCGCGAAG GCGCGCAGGTCGACCTGACGGAACGCGACTAACGCTGGCGACCGCCGACCAGACGCTGG TGTATAAGCTCGCCGACCTGATGAATTAATAATTA
6	Ko_ldhA_FP2 - TATCACTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGCCCTTTTGTGC
7	Ko_ldhA_RP2 - CCTGCGCCGCTAATTATTAATTCATCAGGTC
8	ATGACGTTGCTAAATCCTGCGCCGTCATCTCGCTGCTGATCCCGGGCACCTCCGGGCTACT GCTGTTGCGCACCCCTGGCATCGGCCAGCCCGGGACATTTCTGTTAATGTGGATGAGCGCC AGCCTCGGCGCTATCGGCGATTCTGGCTCTCGTGGCTGACGGGCTACCGCTACCGGTACC ATCTGCATCGTATCCGCTGGCTTAATGCCGAACGCTCGCTCGCGGCCAGTTGTTCTGCGC CGCCACGGCGCGTGGGCAGTCTTTTTAGCCGCTTCTCTCTCCGCTTCGCGCCACCGTGC CGCTGGTAACCGGCGCCAGCGGCACCTCTCTGCGCAGTTTCAGCTCGCCAACGTCAGCTC CGGGCTGCTCTGGCCGCTGATCCTGCTGGCGCCAGGCGCGTTAAGCCTCAGCTTTTGATGA AAGGTATTGCTCTTTAAAGAGATTTCTTAACACCGCGATATGCTCTAGAATTACTATAACCT GCTGATTAAGTAGTTTTAACATTTGTAAGATTATTTAATTATGCTACCGTGACGGTATTATCA CTGGAGAAAAGTCTTTTTCTTGCCCTTTTGTGCTCCCCCTTGC GGGGGGCACATTCAGAT AATCCCCACAGAAATTGCCTGCGATAAAGTTACAATCCCTTCATTTATTAACGATAAAATTTT ATGGAGATTAATGAACAAGTATGCTGCGCTGCTGGCGGTGGGAATGTTGCTATCGGGCTGC GTTTATAACAGCAAGGTGTCGACCAGAGCGGAACAGCTTCAGCACCACCGTTTTGTGCTGAC CAGCGTTAACGGGCAGCCGCTGAATGCCGCGGATAAGCCGCAGGAGCTGAGCTTCGGCGA AAAGATGCCATTACGGGCAAGATGTCTGTTTCAGGTAATATGTGCAACCGCTTCAGCGGCA CGGGCAAAGTCTCTGACGGCGAGCTGAAGGTTGAAGAGCTGGCAATGACCCGCATGCTCTG CACGACTCGCAGCTTAACGCCCTGGACGCCACGCTGAGCAAAATGCTGCGCGAAGGCGC GCAGGTCGACCTGACGGAACGCGACTAACGCTGGCGACCGCCGACCAGACGCTGGTGT TAAGCTCGCCGACCTGATGAATTAATAATTA

ES 2 671 153 T3

	AATATCCGCAGCTGACCATCCGCGTATCCGGCTACGCAGTACGTTTTAACTCCCTGACTAAAG AACAGCAGCAGGACGTTATTACTCGTACCTTCACTCAGACCATGTAA
10	GGGTCAACTGGCGAAAAACTGGCTCAACGTCTATGTTGGTAACCTGATTGGTTGCTTACTGTT TGTATTGCTGATGTGGCTTTCAGGCGAATATATGACTGCCAACGGTCAATGGGGACTTAACGT TCTGCAAACCGCCGACCACAAAATGCACCATACTTTTGTGAAGCCGTGTGCCTGGGTATCCT GGCAAACCTGATGGTCTGCCTTGCCTGATGGATGAGTTACTCCGGCCGTAGCCTGATGGATA AAGCCATGATTATGGTTTTACCGGTGGCAATGTTTGTGCCAGCGGGTTGAGCACAGTATCG CGAACATGTTTATGATCCCGCTGGGTATCGTTATCCGCGACTTTGCAAGCCCGGAATTCTGGA CCGCAGTTGGTTCACTCCGAAAGTTTCTCTCACTGACCGTCATGAACCTCATCACTGATA ACCTGATCCGGTAACTATCGGGAACATCATCGGCGGTGGTCTGCTGGTTGGGTTGACATAC TGGGTCATTTACCTGCGTGGCGACGACCATCACTAAGGGTGTTCAGGCAGTAAATAAAAAA TCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTT ATTACTC
11	Ko_pflB_FP1 - ATCGGATCCGGTCAACTGGCGAAAAACTGGCTCAACGT
12	Ko_pflB_RP1 - GAGTAATAACGTCCTGCTGCTGTAACCTTTTCATTAAGCTCGGACAT
13	ATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTTATTACTCGTACCTTCACTCAGACC ATGTAATGGTATTGACTGAAATCGTACAGTAAAAGCGTACAATAAAGGCTCCACGCAAGTGG GGCCTTTTATAGCAATATCATCCTGCCCCAGTCTCTTTTGTCTGCTGTCTATACTTTATGGATAA CAGCCAAAACAGACTCGACATAGCCTTTGAGCTGTGCATCTACATAGGCCCCGGATGGGCCA AATTCGGAGATATCACCGCAATGTCAACAATTGGTCCGATTCACCTTTGAATCCTGTGGCA CCGTCGATGGCCCGGGATTGCTTTATCACCTTCTCCAGGGCTGCCTGATGCGCTGCCTC TATTGCCACAACCGGATACCTGGGATACCCACGGCGGCAAGAGATTACCGTTGAAGAGCT GATGAAAGAGGTGGTACCTATCGCCACTTTATGAACGCTTCCGGCCGGCGCGTACGGCA TCCGGCGCGGAGGCTATCCTGCAGGCCGAATTTGTTCCGCGACTGGTCCGCGCTGTAAGA AAGAAGGTATTCATACCTGTCTCGATACCAACGGCTTTGTGCGCCGCTACGATCCGGTTATTG ATGAACTGCTGGAGGTCACCGACCTGGTATGCTCGATCTCAAGC
14	Ko_pflB_FP2 - ATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTTATTACTC
15	Ko_pflB_RP2 - ACTGCGGCCGCGCTTGAGATCGAGCATCACCAGGTCGGTGA

16	<p>GGGTCAACTGGCGAAAACTGGCTCAACGTCTATGTTGGTAACCTGATTGGTTGCTTACTGTT TGTATTGCTGATGTGGCTTTCAGGCGAATATATGACTGCCAACGGTCAATGGGGACTTAACGT TCTGCAAACCGCCGACCACAAAATGCACCATACTTTTGTGAAGCCGTGTGCCTGGGTATCCT GGCAAACCTGATGGTCTGCCTTGCGGTATGGATGAGTTACTCCGGCCGTAGCCTGATGGATA AAGCCATGATTATGGTTTTACCGGTGGCAATGTTTGTGCCAGCGGGTTGAGCACAGTATCG CGAACATGTTTATGATCCCGCTGGGTATCGTTATCCGCGACTTTGCAAGCCCGGAATTCTGGA CCGCAGTTGGTTCAACTCCGGAAAGTTTCTCTCACCTGACCGTCATGAACTTCATCACTGATA ACCTGATTCCGGTAACTATCGGGAACATCATCGGCGGTGGTCTGCTGGTTGGTTGACATAC TGGGTCATTTACCTGCGTGGCGACGACCATCACTAAGGGTTGTTTCAGGCAGTAAATAAAAA TCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACATGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTACAGCAGCAGGACGTT ATTACTCGTACCTTCACTCAGACCATGTAATGGTATTGACTGAAATCGTACAGTAAAAAGCGTA CAATAAAGGCTCCACGCAAGTGGGGCCTTTTAGCAATATCATCCTGCCCCAGTCTCTTTTGT CTGCTGTCTATACTTTATGGATAACAGCCAAAACAGACTCGACATAGCCTTTGAGCTGTGCAT CTACATAGGCCCCGGATGGGCCAAATTCGGAGATATCACCGCAATGTCAACAATTGGTCGCA TTCACTCCTTTGAATCCTGTGGCACCGTCGATGGCCCGGGGATTGCTTTATCACCTTCTTCC AGGGCTGCCTGATGCGCTGCCTCTATTGCCACAACCGCGATACCTGGGATACCCACGGCGG CAAAGAGATTACCGTTGAAGAGCTGATGAAAGAGGTGGTGACCTATCGCCACTTTATGAACG CTCCGGCGGGCGGCGTGACGGCATCCGGCGGCGAGGCTATCCTGCAGGCCGAATTTGTTCC GCGACTGGTTCGCGCCTGTAAGAAAGAAGGTATTCATACCTGTCTCGATACCAACGGCTTT GTGCGCCGCTACGATCCGGTTATTGATGAACTGCTGGAGGTCACCGACCTGGTGATGCTCG ATCTCAAGC</p>
----	---

Desarrollo de microorganismo recombinante

- 5 Se transfirieron los fragmentos de ADN producidos a *Klebsiella oxytoca* mediante la utilización de electroporación (25 uF, 200 Ω, 18 kV/cm) y el gen diana fue capaz de eliminarse mediante la utilización de un mecanismo recombinante del microorganismo.
- 10 Se transfirió el fragmento de ADN que incluye la región homóloga de un gen *ldhA* a *Klebsiella oxytoca* silvestre para producir una *Klebsiella oxytoca* recombinante a partir de la cual se eliminó el gen *ldhA* (Ejemplo comparativo 2). Entretanto, después de eliminarse el gen *ldhA* de la *Klebsiella oxytoca* silvestre, se transfirió el fragmento de ADN que incluye la región homóloga de un gen *pflB* para producir *Klebsiella oxytoca* a partir de la cual se eliminó adicionalmente el gen *pflB* junto con la delección del gen *ldhA* (Ejemplo 1).
- 15 Se realizó electroporación y se cultivaron los microorganismos recombinantes a 30 °C durante 1 hora y se estabilizaron. Después, se cultivaron los microorganismos recombinantes mediante dispersión de los mismos en un medio sólido compuesto LB que contiene antibióticos (tales como kanamicina, cloranfenicol y similares) a 37 °C, respectivamente.
- 20 Después, se realizó PCR de colonias en las colonias cultivadas en el medio sólido y se confirmó que se eliminaron los genes correspondientes de las colonias (la Fig. 2 ilustra la delección de *ldhA* y la Fig. 3 ilustra la delección de *pflB*, respectivamente). En el presente caso, para confirmar que se eliminó el gen *ldhA*, se realizó PCR con cebadores de SEQ ID NO: 17 y 18 y para confirmar que se eliminó el gen *pflB*, se realizó PCR con cebadores de SEQ ID NO: 19 y 20 (Tabla 2).

[Tabla 2]

SEQ ID NO.	SECUENCIAS
17	Ko_ldhA_Sc_FP - CCATCTGCATCGTATCCGCTGGCTTAAT
18	Ko_ldhA_Sc_RP - GCTGAAGCGGTTGCACATATTACCTG
18	Ko_pflB_Sc_FP - ACCATCACTAAGGGTTGTTTCAGGCAGTAA
20	Ko_pflB_Sc_RP - GCTAAAAAGGCCCACTTGCGTGGAGCCTT

5 En la próxima prueba, se utilizó una *Klebsiella oxytoca* silvestre como ejemplo comparativo 1. Entretanto, se produjo una *Klebsiella oxytoca* recombinante a partir de la cual se eliminaron los genes *ldhA* y *adhE* mediante la delección adicional del gen *adhE* de la *Klebsiella oxytoca* recombinante de la cual se eliminó *ldhA* de acuerdo con el ejemplo comparativo 2, siendo el gen *adhE* un gen que codifica una enzima de deshidrogenación de alcoholes (aldehído/alcohol deshidrogenasa) implicada directamente la aparición de etanol. Se comprobó la *Klebsiella oxytoca* recombinante producida a partir de la cual se eliminaron los genes *ldhA* y *adhE* como el ejemplo comparativo 3. Se eliminó el gen *adhE* de forma similar al método para eliminar el gen *ldhA* o el gen *pflB*. Se transfirió el fragmento de ADN que incluye la región homóloga del gen *adhE* a la *Klebsiella oxytoca* de la cual se eliminó el *ldhA*, produciendo así *Klebsiella oxytoca* a partir de la cual se eliminó adicionalmente el gen *adhE* junto con la delección del gen *ldhA*.

15 <Ejemplo experimental 2>

Se realizó un cultivo discontinuo mediante la utilización de microorganismos del ejemplo 1, ejemplos comparativo 1 y 2 preparados en el Ejemplo comparativo 1 anterior. En primer lugar, se inocularon cepas de *Klebsiella oxytoca* en 250 ml de medio compuesto que incluye 9 g/l de glucosa (50 mM) y se cultivaron a 37 °C durante 16 horas y, luego, se inocularon los fluidos de cultivo en 3 l de medio compuesto y se cultivaron. En el presente caso, se realizó la fermentación en condiciones microaerobias (una velocidad aeróbica de 1 vvm y una velocidad de agitación de 150 rpm) a una concentración inicial de glucosa de 90 g/l, pH 6,8 y una temperatura de cultivo de 37 °C. Se utilizó NH₄OH 5N para controlar el pH durante la fermentación. Se tomaron muestras de las cepas de *Klebsiella oxytoca* durante la fermentación y se obtuvieron tasas de crecimiento mediante la medición de la densidad óptica a 600 (DO 600) de las muestras tomadas. Después, se centrifugaron las muestras tomadas a 13.000 rpm durante 10 minutos y se analizaron metabolitos del sobrenadante y la concentración de 2,3-butanodiol de las mismas mediante cromatografía líquida (HPLC).

30 Como resultado, en la cepa del Ejemplo comparativo 2, la cantidad de producción de 2,3-butanodiol fue 29,91 g/l y el rendimiento de producción de 2,3-butanodiol (gramos de 2,3-butanodiol / gramos de glucosa) fue 0,32. Además, en la cepa del Ejemplo comparativo 2, la productividad (g/l/h) de 2,3-butanodiol fue 1,07 y la selectividad del mismo fue 59 %. En comparación con el ejemplo comparativo 1, que es una *Klebsiella oxytoca* silvestre, se confirmó que la cepa recombinante del Ejemplo comparativo 2 mejoró toda la concentración de producción, rendimiento de producción, productividad y selectividad de 2,3-butanodiol mientras disminuyó la producción de ácido láctico y aumentó la capacidad de producción de 2,3-butanodiol. Sin embargo, la *Klebsiella oxytoca* recombinante del ejemplo comparativo 2 todavía producía cantidades excesivas de subproductos que incluyen ácido fórmico y etanol, que se consideran como una causa de la inhibición de la concentración de producción, rendimiento de producción, selectividad y similares, de 2,3-butanodiol del ejemplo comparativo 2 (la figura 4 ilustra el ejemplo comparativo 1 y la figura 5 ilustra el ejemplo comparativo 2).

40 Entretanto, en comparación con el ejemplo comparativo 2 (*Klebsiella oxytoca* Δ *ldhA*, 2,3-BDO 29,91 g/l), en la cepa recombinante del ejemplo 1, aumentó la cantidad de producción de 2,3-butanodiol a 39,17 \pm 1,51 g/l. Además, se confirmó en la cepa recombinante del ejemplo 1 que la cantidad de producción de ácido fórmico se redujo en un 90 % o más y la cantidad de producción de etanol se redujo en un 73 % o más y el rendimiento de producción de 2,3-butanodiol (gramos de 2,3-butanodiol / gramos de glucosa) también aumentó significativamente de 0,32 a 0,45. Tras considerar que un rendimiento teórico de 2,3-butanodiol (un rendimiento cuando se supone que toda la glucosa suministrada a *Klebsiella oxytoca* se convierte en 2,3-butanodiol) es 0,5, un rendimiento del ejemplo 1 (el rendimiento teórico del mismo es 90 %) fue notablemente alto.

50 Por consiguiente, se pudo confirmar que la aparición de subproductos disminuyó notablemente y se produjo 2,3-butanodiol con alta pureza mediante la eliminación simultánea de subproductos tales como ácido fórmico, etanol y similares, a través de la delección de los genes *ldhA* y *pflB*. Con respecto a esto, se pudo confirmar que la delección del gen (*ldhA*), que codifica la enzima de deshidrogenación del ácido láctico (lactato deshidrogenasa) de *Klebsiella oxytoca*, y el gen (*pflB*), que codifica la piruvato-formiato liasa, es, significativamente, importante para la producción de 2,3-butanodiol en diversas etapas de rutas para producir 2,3-butanodiol (Figura 6) (Tabla 3).

55

[Tabla 3]

Cepa	2,3-butanodiol				Concentración (g/l) de subproductos					
	Concentración (g/l)	Rendimiento (g/g)	Productividad (g/l/h)	Selectividad (%)	Lactato	Ácido succínico	Etanol	Ácido fórmico	Ácido acético	
Ejemplo comparativo 1	17,31	0,18	0,58	27	32,20	1,92	1,61	3,88	1,27	
Ejemplo comparativo 2	29,91	0,32	1,07	59	1,93	2,27	3,54	6,11	0,92	
Ejemplo 1	39,17 ± 1,51	0,45	0,43 ± 0,02	83,33 ± 1,53	3,24	1,77	0,53	0,97	0,15	

<Ejemplo experimental 3>

Se probó si se mejoró o no la capacidad de producción de 2,3-butanodiol en el momento de eliminar un gen implicado en la aparición de subproductos en competición con la biosíntesis de 2,3-butanodiol en un microorganismo que produce 2,3-butanodiol. adhE es un gen que codifica una enzima de deshidrogenación de alcoholes (aldehído/alcohol deshidrogenasa) directamente implicada en la aparición de etanol, que es un subproducto en la producción de 2,3-butanodiol. Por consiguiente, se cultivó la *Klebsiella oxytoca* recombinante del ejemplo comparativo 3, de la cual se eliminaron *ldhA* y *adhE*, y se comparó con la del ejemplo 1. En el presente caso, las condiciones de cultivo del microorganismo recombinante del ejemplo comparativo 3 fueron las mismas que aquellas del ejemplo experimental 2.

Como resultado, en el ejemplo comparativo 3, del cual se eliminaron simultáneamente *ldhA* y *adhE* de *Klebsiella oxytoca*, la cantidad de producción de 2,3-butanodiol disminuyó bastante para ser 25,96 g/l en comparación con el ejemplo comparativo 2 (*Klebsiella oxytoca* Δ *ldhA*, 2,3-BDO 29,91 g/l). Además, en el ejemplo comparativo 3, el rendimiento de producción de 2,3-butanodiol fue 0,27, que fue menor que el del ejemplo comparativo 2 (0,32) y la selectividad del mismo fue del 55 %, que fue menor que la del ejemplo comparativo 2 (59 %) y la productividad (g/l/h) fue 0,36, que es notablemente menor que la del ejemplo comparativo 2 (1,07). Además, en el ejemplo comparativo 3, la cantidad de producción de etanol disminuyó en comparación con el ejemplo comparativo 2; sin embargo, la capacidad de producción de 2,3-butanodiol se deterioró bastante.

Además, aunque se compara con el ejemplo 1, pudo apreciarse que la capacidad de producción de 2,3-butanodiol del ejemplo comparativo 3 disminuyó notablemente (Tabla 4). Por consiguiente, se pudo confirmar que a pesar de que se eliminó el gen implicado en la aparición de subproductos, no fue favorable para la producción de 2,3-butanodiol.

[Tabla 4]

Cepa	2,3-butanodiol				Concentración (g/l) de subproductos					
	Concentración (g/l)	Rendimiento (g/g)	Productividad (g/l/h)	Selectividad (%)	Lactato	Ácido succínico	Etanol	Ácido fórmico	Ácido acético	
Ejemplo comparativo 1	17,31	0,18	0,58	27	32,20	1,92	1,61	3,88	1,27	
Ejemplo comparativo 2	29,91	0,32	1,07	59	1,93	2,27	3,54	6,11	0,92	
Ejemplo comparativo 3	25,96	0,27	0,36	55	2,71	2,32	0,89	4,13	6,43	
Ejemplo 1	39,17 ± 1,51	0,45	0,43 ± 0,02	83,33 ± 1,53	3,24	1,77	0,53	0,97	0,15	

<Ejemplo experimental 4> Cambio en la producción de 2,3-butanodiol de acuerdo con el cambio en la cantidad de suministro de oxígeno

Se evaluaron los efectos del cambio en la cantidad de oxígeno disuelto en un medio que depende de la velocidad de agitación durante el cultivo, en un rendimiento de producción, una productividad y selectividad de 2,3-butanodiol mediante la utilización de la *Klebsiella oxytoca* recombinante del ejemplo 1.

En primer lugar, se inoculó el microorganismo recombinante del ejemplo 1 en 250 ml de medio compuesto que incluye 9 g/l de glucosa (50 mM) y se cultivó a 37 °C durante 16 horas. Después, se inoculó el fluido de cultivo obtenido en 3 l de medio compuesto y se realizó fermentación discontinua. La fermentación se realizó en condiciones microaerobias (velocidad aeróbica de 1 vvm), a una concentración inicial de glucosa de 90 g/l, pH 6,8 y una temperatura de cultivo de 37 °C, con diversas velocidades de agitación, por ejemplo, 150 rpm, 250 rpm, 350 rpm y 450 rpm. Se utilizó NH₄OH 5N para controlar el pH durante la fermentación. Se tomaron muestras de las cepas de *Klebsiella oxytoca* recombinante durante la fermentación y se obtuvieron tasas de crecimiento mediante la medición de la densidad óptica a 600 (DO 600) de las muestras tomadas. Después, se centrifugaron las muestras tomadas a 13.000 rpm durante 10 minutos y se analizaron metabolitos del sobrenadante y la concentración de 2,3-butanodiol (2,3-BDO) de las mismas mediante cromatografía líquida (HPLC).

Como resultado, en la cepa de *Klebsiella oxytoca* recombinante del ejemplo 1, la productividad (g/l/h) de 2,3-butanodiol fue cambiando en gran medida dependiendo del cambio en la velocidad de agitación. Es decir, se pudo confirmar que en el momento de la agitación a una velocidad de agitación de 450 rpm, la productividad de 2,3-butanodiol aumentó en 5 veces o más en comparación con la agitación a una velocidad de agitación de 150 rpm (Tabla 5, Figura 7 a 11). Se pudo confirmar que el cambio en la cantidad de suministro de oxígeno que depende de la velocidad de agitación pudo mejorar la productividad del ejemplo 1.

[Tabla 5]

Velocidad de agitación (rpm)	2,3-Butanodiol			
	Concentración (g/l)	Rendimiento (g/g)	Productividad (g/l/h)	Selectividad (%)
150	39,17 ± 1,51	0,45	0,43 ± 0,02	83,33 ± 1,53
250	33,51 ± 0,23	0,39 ± 0,01	0,77 ± 0,02	84
350	31,39 ± 1,68	0,37 ± 0,02	1,40 ± 0,12	80 ± 1,00
450	30,79 ± 1,46	0,35 ± 0,02	2,71 ± 0,21	84 ± 4,58

<Ejemplo experimental 5> Producción de 2,3-butanodiol a través de fermentación discontinua alimentada en condiciones aerobias (agitación a velocidad de agitación de 450 rpm)

Se realizó fermentación discontinua alimentada para producir 2,3-butanodiol mediante la utilización de la cepa del ejemplo 1 mientras se mantiene una velocidad de agitación de 450 rpm que presentó la productividad más mejorada basándose en los resultados de ejemplo experimental 4.

En primer lugar, se inoculó la cepa de *Klebsiella oxytoca* recombinante del ejemplo 1 en 250 ml de medio compuesto que incluye 9 g/l de glucosa (50 mM) y se cultivó a 37 °C durante 16 horas y, luego, se inoculó el fluido de cultivo obtenido en 3 l de medio compuesto y se realizó el cultivo discontinuo alimentado. En el presente caso, la fermentación se realizó en condiciones microaerobias (velocidad aeróbica de 1 vvm), a una concentración inicial de glucosa de 90 g/l, pH 6,8 y una temperatura de cultivo de 37 °C. La velocidad de agitación se mantuvo constantemente a 450 rpm. Se utilizó NH₄OH 5N para controlar el pH durante la fermentación. Cuando disminuyó la concentración de glucosa a 10 g/l o menos durante la fermentación, se introdujo una solución de glucosa de 700 g/l o más. Se tomó una muestra de la cepa de *Klebsiella oxytoca* recombinante durante la fermentación y se obtuvo una tasa de crecimiento mediante la medición de la densidad óptica a 600 (DO 600) de la muestra tomada. Después, se centrifugó la muestra tomada a 13.000 rpm durante 10 minutos y se analizaron el metabolito del sobrenadante y la concentración de 2,3-butanodiol de la misma mediante cromatografía líquida (HPLC).

Como resultado, se pudo confirmar que cuando la velocidad de agitación se mantuvo continuamente a 450 rpm, la capacidad de producción de 2,3-butanodiol no se mantuvo de forma continua (Tabla 6). En particular, se pudo confirmar que cuando la concentración de acetoina era superior a 10 g/l, la capacidad de producción de 2,3-butanodiol disminuyó notablemente (Figura 12). Se pudo apreciar que se necesitó que se controlara la velocidad de agitación del cultivo discontinuo alimentado basándose en los resultados del cultivo discontinuo alimentado realizado a la velocidad de agitación mantenida a 450 rpm, y se necesitó que se determinase un punto temporal para controlar la velocidad de agitación basándose en la concentración de acetoina a acumularse.

[Tabla 6]

Cepa	2,3-Butanodiol						
	Concentración (g/l)	Productividad (g/l/h)	Rendimiento (g/g)	Selectividad (%)	Acetoína (g/l)	Ácido succínico (g/l)	Ácido acético (g/l)
Ejemplo 1	57,7	1,65	29	63	13,44	12,38	5,32

<Ejemplo experimental 6> Producción de 2,3-butanodiol a través de fermentación discontinua alimentada

- 5 Se inoculó la cepa de *Klebsiella oxytoca* recombinante del ejemplo 1 en 250 ml de medio compuesto que incluye 9 g/l de glucosa (50 mM) y se cultivó a 37 °C durante 16 horas. Después, se inoculó el fluido de cultivo obtenido en 3 l de medio compuesto y se realizó el cultivo discontinuo alimentado. En el presente caso, se realizó la fermentación en condiciones microaerobias (velocidad aeróbica de 1 vvm), a una concentración inicial de glucosa de 90 g/l, pH 6,8, una temperatura de cultivo de 37 °C y una velocidad de agitación de 450 rpm. Se utilizó NH₄OH 5N para controlar el pH durante la fermentación. Cuando disminuyó la concentración de glucosa a 10 g/l o menos durante la fermentación, se introdujo una solución de glucosa de 700 g/l o más. Además, en un punto temporal en el que la concentración de acetoína, que es uno de los subproductos, es 7 g/l, se realizó la fermentación mediante el cambio de la velocidad de agitación de 450 a 350 rpm. Se tomó una muestra de la cepa de *Klebsiella oxytoca* recombinante durante la fermentación y se obtuvo una tasa de crecimiento mediante la medición de la densidad óptica a 600 (DO 600) de la muestra tomada. Después, se centrifugó la muestra tomada a 13.000 rpm durante 10 minutos y se analizaron el metabolito del sobrenadante y la concentración de 2,3-butanodiol de la misma mediante cromatografía líquida (HPLC).

- 20 Como resultado, en comparación con el cultivo discontinuo alimentado realizado mediante el mantenimiento de manera uniforme de la velocidad de agitación a 450 rpm en el ejemplo experimental 5, toda la concentración, la productividad, el rendimiento y la selectividad de 2,3-butanodiol aumentó en gran medida en 74,5 %, 29,7 %, 55,2 % y 27,0 %, respectivamente. Por lo tanto, se pudo confirmar que la producción de 2,3-butanodiol que utiliza la cepa recombinante del ejemplo 1 se vio afectada en gran medida por el control de la cantidad de oxígeno disuelto que depende de la velocidad de agitación. Por consiguiente, se determinó que la productividad de 2,3-butanodiol pudo mejorarse mediante el control de la velocidad de agitación para controlar la cantidad de oxígeno disuelto en el medio (Tabla 7, Figura 13).

[Tabla 7]

Cepa	2,3-Butanodiol					
	Concentración (g/l)	Productividad (g/l/h)	Selectividad (%)	Acetoína (g/l)	Ácido succínico (g/l)	Ácido acético (g/l)
Ejemplo 1	100,66	2,14	80	5,19	14,76	2,73

30 [APLICABILIDAD INDUSTRIAL]

- La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante que tiene capacidad mejorada de producir 2,3-butanodiol, en donde se inhibe una ruta para convertir piruvato en acetil-CoA, una ruta para convertir piruvato en ácido fórmico y una ruta para convertir piruvato en lactato en un microorganismo que tiene rutas biosintéticas de acetil-CoA y lactato, en donde el microorganismo es *Klebsiella*. El microorganismo recombinante de la presente invención puede producir 2,3-butanodiol con alta selectividad y concentración.

<110> GS CALTEX CORPORATION

- 40 <120> MICROORGANISMO RECOMBINANTE QUE TIENE CAPACIDAD MEJORADA DE PRODUCIR BUTANODIOL Y MÉTODO PARA PRODUCIR BUTANODIOL QUE UTILIZA EL MISMO

<130> DOP130178PCT

- 45 <150> 10-2013-0028884
<151> 18/03/2013

<150> 10-2013-0114791
<151> 26/09/2013

- 50 <160> 20

ES 2 671 153 T3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 990

5 <212> ADN

<213> Klebsiella oxytoca

<400> 1

atgaaaatcg ctgtgtatag tacaaaacag tacgacaaga agtatctgca gcatgttaat	60
gatgcatatg gctttgaaact ggagtttttt gacttcctgc taaccgaaaa aaccgcaaaa	120
accgccaacg gctgtgaagc ggtgtgtatc ttcgtaaacg atgacggtag ccgcccggta	180
cttgaagaac tgaagccca cggcgtgcag tacatcgcgc tgcgctgcgc ggggttcaac	240
aacgttgacc tcgatgccgc caaagagctg ggcctgcggg tggcgcgct cccggcctac	300
tcgccggaag cgctcgctga gcacgcgatc ggcatgatga tgcgctgaa ccgccgatt	360
caccgtgcct atcagcgcac ccgcgacgcg aacttctctc tgggaaggct gaccggttc	420
accatgcacg gtaaaaccgc cggcgttatt ggcaccggta aaatcggcgt cgccgcgctg	480
cgcattctta aaggcttcgg tatgctctg ctggcgtttg atccctacc aagcgcgcc	540
gcgctggata tggcgtgga gtatgtcgat cttgaaacc tgtaccgga gtccgatgtt	600
atctcactgc actgccact gaccgatgaa aactaccatt tgctgaacca tgccgcgttc	660
gatcgcatag aagacggggt gatgatcatc aacaccagcc gggcgcgct catcgattcg	720
caggcagcga tcgacgccct gaagcatcag aaaattggcg cgctggggat ggacgtgat	780
gagaacgaac gcgatctggt ctttgaagat aagtctaag acgtgattca ggatgatgtg	840
ttccgccgtc tctccgcctg ccataacgtc ctgttaccg gtcaccaggc gtttctgacc	900
gcggaagcgt tgatcagcat ttcgcaaacc accctcgaca acctgcgtca agtggatgca	960
ggcgaaacct gtcctaaccg actggtctga	990

10

<210> 2

<211> 595

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> homólogo del gen ldhA

20

<400> 2

ES 2 671 153 T3

	atgacgttcg ctaaactcctg cgccgtcatc tcgctgctga tcccgggcac ctccgggcta	60
	ctgctgttcg gcaccctggc atcggccagc ccgggacatt tcctgttaat gtggatgagc	120
	gccagcctcg gcgctatcgg cggattctgg ctctcgtggc tgacgggcta ccgctaccgg	180
	taccatctgc atcgtatccg ctggcttaat gccgaacgcc tcgctcgcgg ccagttgttc	240
	ctgcgccgcc acggcgcgtg ggcagtcttt tttagccgct ttctctctcc gcttcgcgcc	300
	accgtgccgc tggtaaccgg cgccagcggc acctctctct ggcagtttca gctcgccaac	360
	gtcagctccg ggctgctctg gccgctgac ctgctggcgc caggcgcgtt aagcctcagc	420
	ttttgatgaa aggtattgtc ttttaaagag atttcttaac accgcgatat gctctagaat	480
	tattactata acctgctgat taaactagtt tttaacattt gtaagattat ttttaattatg	540
	ctaccgtgac ggtattatca ctggagaaaa gtcttttttc cttgcccttt tgtgc	595
5	<210> 3 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 3 cacggatcca tgacgttcg taaactcctg 30	
15	<210> 4 <211> 40 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 4 gcacaaaagg gcaaggaaaa aagactttc tccagtgata 40	
25	<210> 5 <211> 591 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> homólogo del gen ldhA	
	<400> 5	
35	tatcactgga gaaaagtctt ttttccttgc ccttttgtgc tcccccttcg cggggggcac	60

ES 2 671 153 T3

	attcagataa tccccacaga aattgcctgc gataaagtta caatcccttc atttattaat	120
	acgataaata tttatggaga ttaaatgaac aagtatgctg cgctgctggc ggtgggaatg	180
	ttgctatcgg gctgcgttta taacagcaag gtgtcgacca gagcggaca gcttcagcac	240
	caccgttttg tgctgaccag cgtaacggg cagccgctga atgccgcgga taagccgcag	300
	gagctgagct tcggcgaaaa gatgccatt acgggcaaga tgtctgtttc aggtaatatg	360
	tgcaaccgct tcagcggcac gggcaaagtc tctgacggcg agctgaaggt tgaagagctg	420
	gcaatgacc gcctgctctg cacggactcg cagcttaacg ccctggacgc cacgctgagc	480
	aaaatgctgc gcgaaggcgc gcaggctgac ctgacggaaa cgcagctaac gctggcgacc	540
	gccgaccaga cgctgggtgta taagctogcc gacctgatga attaataatt a	591
5	<210> 6 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador <400> 6	
	tactactgga gaaaagtctt tttccttgc cctttgtgc	40
15	<210> 7 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador <400> 7	
25	cctgcgccg ctaattatta attcatcagg tc	32
30	<210> 8 <211> 1146 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> fragmento de ADN	
35	<400> 8	
	atgacgttcg ctaaactcctg cgccgctcctc tcgctgctga tcccgggcac ctccgggcta	60
	ctgctgttcg gcaccctggc atcggccagc ccgggacatt tcctgttaat gtggatgagc	120
	gccagcctcg gcgctatcgg cggattctgg ctctcgtggc tgacgggcta ccgctaccgg	180
	taccatctgc atcgtatccg ctggcttaat gccgaacgcc tcgctcgcgg ccagttgttc	240

ES 2 671 153 T3

ctgcgccgcc acggcgcgtg ggcagtcttt tttagccgct ttctctctcc gcttcgcgcc 300
accgtgccgc tggtaaccgg cgccagcggc acctctctct ggcagtttca gctcgccaac 360
gtcagctccg ggctgctctg gccgctgac ctgctggcgc caggcgcggt aagcctcagc 420
ttttgatgaa aggtattgtc ttttaaagag atttcttaac accgcgatat gctctagaat 480
tattactata acctgctgat taaactagtt tttaacattt gtaagattat ttttaattatg 540
ctaccgtgac ggtattatca ctggagaaaa gtcttttttc cttgcccttt tgtgctcccc 600
cttcgcgggg ggcacattca gataatcccc acagaaattg cctgcgataa agttacaatc 660
ccttcattta ttaatacgat aaatatttat ggagattaaa tgaacaagta tgctgcgctg 720
ctggcgggtg gaatggtgct atcgggctgc gtttataaca gcaaggtgtc gaccagagcg 780
gaacagcttc agcaccaccg ttttgtgctg accagcgtta acgggcagcc gctgaatgcc 840
gcgataaagc cgcaggagct gagcttcggc gaaaagatgc ccattacggg caagatgtct 900
gtttcaggta atatgtgcaa ccgcttcagc ggacacgggca aagtctctga cggcgagctg 960
aaggttgaag agctggcaat gacccgatg ctctgcacgg actcgcagct taacgccctg 1020
gacgccacgc tgagcaaaat gctgcgcgaa ggcgcgcagg tcgacctgac ggaaacgcag 1080
ctaacgctgg cgaccgccga ccagacgctg gtgtataagc tcgccgacct gatgaattaa 1140
taatta 1146

<210> 9
<211> 2283
<212> ADN
<213> Klebsiella oxytoca

5

<400> 9

atgtccgagc ttaatgaaaa gttagccaca gcctgggaag gttttgcgaa aggtgactgg 60
cagaacgaag tcaacgtccg cgacttcac cagaaaaact ataccccgta cgaaggtgac 120
gagtccttcc tggctggcgc aactgacgcg accaccaagc tgtgggacac cgtaatggaa 180
ggcgtaaac aggaaaaccg cactcacgcg cctgttgatt ttgatacttc ccttgcaccc 240
accatcactt ctcatgacgc tggctacac gagaaaggtc tcgagaaaaat cgttggctctg 300
cagactgaag ctccgctgaa acgcgcgatt atcccgttcg gcggcatcaa aatggtcgaa 360
ggttcctgca aagcgtacga tcgcgagctg gacccgatgc tgaagaaaat cttactgaa 420
taccgtaaaa ctcaaacca gggcgtgttt gacgtttaca ccaaagacat cctgaactgc 480
cgtaaatctg gtgttctgac cggctctgcc gatgcctatg gccgtggctg tatcatcggt 540
gactaccgtc gcggttcgct gtacggatc gacttcctga tgaagacaa atacgctcag 600
ttcgtttctc tgcaagagaa actggaaaac ggcgaagatc tggaagcaac catccgtctg 660
cgcgaagaaa tctctgaaca gcaccgcgcg ctgggtcaga tcaaagaaat ggcggctaaa 720

10

ES 2 671 153 T3

tatggctgcg	atatctctg	tcctgctacc	accgctcagg	aagctatcca	gtggacctac	780
ttcggttacc	tggctgccgt	aaaatctcag	aacggcgcg	caatgtcctt	cggtcgtacc	840
tccagcttcc	tggacatctt	catcgaacgt	gacctgaaag	ccggtaaaat	caccgagcaa	900
gacgcacagg	aatgattga	ccacctggtc	atgaaactgc	gtatggttcg	tttctctcgt	960
accctgaat	atgatgaact	gttctctggc	gacccgatct	gggcaacaga	atctatcggc	1020
ggtatggg	ttgacggccg	tactctggtc	accaaaaaaca	gcttccggtt	cctgaacacc	1080
ctgtacacca	tggggccg	tccggagccg	aacatcacca	ttctgtggtc	tgaaaaactg	1140
ccgctgagct	tcaaaaaata	cgccgcgaaa	gtgtccatcg	atacctcttc	tctgcagtac	1200
gagaacgatg	acctgatg	tcctgacttc	aacaacgatg	actacgctat	cgcttgctgc	1260
gtaagccga	tggttggtg	taagcaaatg	cagttcttcg	gcgcgctgc	taacctggcg	1320
aaaaccatgc	tgtacgcaat	caacggcg	gttgatgaaa	aactgaaaat	gcaggttggt	1380
cctaaatctg	aaccgatcaa	aggcgacgtt	ctgaacttcg	acgaagtgat	ggaccgatg	1440
gatcacttca	tggactggct	ggctaaacag	tacgtcactg	cgctgaacat	catccactac	1500
atgcacgaca	agtacagcta	cgaagcttcc	ctgatggcgc	tgcacgaccg	tgatgttatc	1560
cgcaccatgg	catgtggtat	cgcaggtcct	tccgttgcg	ctgactccct	gtctgcaatc	1620
aaatatgcga	aagttaaacc	gattcgtgac	gaaaacggtc	tggctgtcga	cttcgaaatc	1680
gaaggcgaat	acccgcagtt	tggtaacaac	gactctcgcg	tcgatgatat	ggccggtgac	1740
ctggttgaac	gtttcatgaa	gaaaattcag	aaactgcaca	cctaccgcaa	cgctatcccg	1800
actcagtc	ttctgacat	cacctctaac	gttgtgatg	gtaagaaaac	cggaacacc	1860
cctgacggtc	gtcgcgctgg	cgctccgttc	ggaccaggtg	ctaaccgat	gcacggccgt	1920
gaccagaaag	gcgctggtgc	ctctctgacc	tccgttgcaa	aactgccgtt	tgcttacg	1980
aaagatggta	tttcttacac	cttctctatc	gtgccgaacg	cgctgggtaa	agacgacgaa	2040
gttcgtaaaa	ctaacctcgc	cggcctgatg	gatggttact	tccaccacga	agcgtccatc	2100
gaaggcggtc	agcatctgaa	cgtcaacgtt	atgaaccg	aatgctgct	cgacgcgatg	2160
gaaaaccgg	aaaaatatcc	gcagctgacc	atccgcgtat	ccggctacgc	agtacgtttt	2220
aactccctga	ctaaagaaca	gcagcaggac	gttattactc	gtaccttcac	tcagaccatg	2280
taa						2283

<210> 10
 <211> 635
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> homólogo del gen pflB

<400> 10

5

10

ES 2 671 153 T3

	gggtcaactg gcgaaaaact ggctcaacgt ctatgttggt aacctgattg gttgcttact	60
	gtttgtattg ctgatgtggc tttcaggcga atatatgact gccaacggtc aatggggact	120
	taacgttctg caaaccccg accacaaaat gcaccatact tttgttgaag ccgtgtgcct	180
	gggtatcctg gcaaacctga tggctctgcct tgcggtatgg atgagttact ccggccgtag	240
	cctgatggat aaagccatga ttatggtttt accggtggca atgtttgttg ccagcggggt	300
	tgagcacagt atcgcgaaca tgtttatgat cccgctgggt atcgttatcc gcgactttgc	360
	aagcccggaa ttctggaccg cagttggttc aactccggaa agtttctctc acctgaccgt	420
	catgaacttc atcactgata acctgattcc ggtaactatc ggaacatca tcggcggtag	480
	tctgctggtt gggttgacat actgggtcat ttacctgctg ggcgacgacc atcactaagg	540
	gttgtttcag gcagtaaata aaaaatccac ttaagaaggt aggtgttaca tgtccgagct	600
	taatgaaaag ttacagcagc aggacgttat tactc	635
5	<210> 11 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 11 atcggatccg ggtaactgg cgaaaaactg gctcaacgt 39	
15	<210> 12 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 12 gagtaataac gtctgctgc tgtaacttt cattaagctc ggacat 46	
25	<210> 13 <211> 669 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> homólogo del gen pflB	
	<400> 13	
35	atgtccgagc ttaatgaaa gttacagcag caggacgtta ttactcgtac cttcactcag	60

ES 2 671 153 T3

	accatgtaat ggtattgact gaaatcgta agtaaaaagc gtacaataaa ggctccacgc	120
	aagtggggcc tttttagcaa tatcatcctg ccccagtctc ttttgtctgc tgtctatact	180
	ttatggataa cagccaaaac agactcgaca tagcctttga gctgtgcatc tacataggcc	240
	ccggatgggc caaattcggg gatatcaccg caatgtcaac aattggtcgc attcactcct	300
	ttgaatcctg tggcaccgtc gatggcccgg ggattcgctt tatcaccttc ttccagggct	360
	gcctgatgcy ctgcctctat tgccacaacc gcgatacctg ggataccac ggcggcaaag	420
	agattaccgt tgaagagctg atgaaagagg tggtgacctt togccacttt atgaacgctt	480
	ccggcggcgg cgtgacggca tccggcggcg aggctatcct gcaggccgaa tttgttcgcy	540
	actggttccg cgcctgtaag aaagaaggta ttcatacctg tctcgatacc aacggctttg	600
	tgcgccgcta cgatccggtt attgatgaac tgctggaggc caccgacctg gtgatgctcy	660
	atctcaagc	669
5	<210> 14 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 14 atgtccgagc ttaatgaaaa gttacagcag caggacgta ttactc	46
15	<210> 15 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 15 actgcggccg cgcttgagat cgagcatcac caggtcggtg a	41
25	<210> 16 <211> 1258 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> fragmento de ADN	
	<400> 16	
	gggtcaactg gcgaaaaact ggctcaacgt ctatgttggt aacctgattg gttgcttact	60
35	gtttgtattg ctgatgtggc tttcaggcga atatatgact gccaacggtc aatggggact	120

ES 2 671 153 T3

taacgttctg caaacccg ccg accacaaaat gcaccatact tttggtgaag ccgtgtgcct 180
 gggatcctg gcaaacctga tggctctgcct tgcggtatgg atgagttact ccggccgtag 240
 cctgatggat aaagccatga ttatggtttt accggtggca atgtttggtg ccagcggggt 300
 tgagcacagt atcgcgaaca tgtttatgat cccgctgggt atcgttatcc gcgactttgc 360
 aagcccggaa ttctggaccg cagttggttc aactccggaa agtttctctc acctgaccgt 420
 catgaacttc atcactgata acctgattcc ggtaactatc gggaacatca tcggcgggtg 480
 tctgctgggt gggttgacat actgggtcat ttacctgcgt ggcgacgacc atcactaagg 540
 gttgtttcag gcagtaaata aaaaatccac ttaagaaggt aggtgttaca tgtccgagct 600
 taatgaaaag ttacagcagc aggacgttat tactcgtacc ttcactcaga ccatgtaatg 660
 gtattgactg aaatcgtaca gtaaaaagcg tacaataaag gctccacgca agtggggcct 720
 ttttagcaat atcatcctgc cccagctctt tttgtctgct gtctatactt tatggataac 780
 agccaaaaca gactcgacat agcctttgag ctgtgcatct acataggccc cggatgggcc 840
 aaattcggag atatcaccgc aatgtcaaca attggtcgca ttcactcctt tgaatcctgt 900
 ggcaccgtcg atggcccggt gattcgtttt atcaccttct tccagggctg cctgatgcgc 960
 tgcctctatt gccacaaccg cgatacctgg gatacccacg gcggcaaaga gattaccgtt 1020
 gaagagctga tgaaagaggt ggtgacctat cgccacttta tgaacgcttc cggcggcggc 1080
 gtgacggcat ccggcggcga ggctatcctg caggccgaat ttgttcgcga ctggttccgc 1140
 gcctgtaaga aagaaggtat tcatacctgt ctcgatacca acggctttgt gcgccgctac 1200
 gatccggtta ttgatgaact gctggaggtc accgacctgg tgatgctcga tctcaagc 1258

5 <210> 17
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> cebador

 <400> 17
 ccatctgcat cgtatccgct ggcttaat 28

 15 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> cebador

 <400> 18
 gctgaagcgg ttgcacatat tacctg 26

 25 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 671 153 T3

<220>
<223> cebador

5 <400> 19
accatcacta agggttggtt caggcagtaa 30

<210> 20
<211> 30
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

15 <400> 20
gctaaaaagg cccacttgc gtggagcctt 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo recombinante que tiene capacidad mejorada de producir 2,3-butanodiol, en donde se inhiben una ruta para convertir piruvato en acetil-CoA, una ruta para convertir piruvato en ácido fórmico y una ruta para convertir piruvato en lactato en un microorganismo que tiene rutas biosintéticas de acetil-CoA y lactato, y el microorganismo es Klebsiella.
- 10 2. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en el que se inhiben la ruta para convertir piruvato en acetil-CoA y la ruta para convertir piruvato en ácido fórmico mediante la inhibición de la piruvato-formiato liasa.
3. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en el que se inhibe la ruta para convertir piruvato en lactato mediante la inhibición de la lactato deshidrogenasa.
- 15 4. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en el que se eliminan o se inhiben pflB y ldhA, siendo el pflB un gen que codifica piruvato-formiato liasa y siendo el ldhA un gen que codifica lactato deshidrogenasa.
5. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en el que no se elimina un gen que codifica una enzima para convertir acetil-CoA en etanol.
- 20 6. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en el que la selectividad de 2,3-butanodiol es del 70 % o más basada en cultivo discontinuo.
7. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en el que el rendimiento de 2,3-butanodiol es 0,35 g/g o más basado en cultivo discontinuo.
- 25 8. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en el que la selectividad de 2,3-butanodiol es del 70 % o más basada en cultivo discontinuo alimentado.
- 30 9. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, en el que la selectividad de 2,3-butanodiol es del 80 % o más basada en cultivo discontinuo alimentado.
10. Un método para producir 2,3-butanodiol, comprendiendo el método:
- 35 cultivar el microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y recuperar 2,3-butanodiol del cultivo.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el cultivo se realiza en condiciones aerobias.
- 40 12. El método de la reivindicación 10, en donde el cultivo controla la productividad de 2,3-butanodiol mediante el control de la cantidad de suministro de oxígeno.

Fig.1

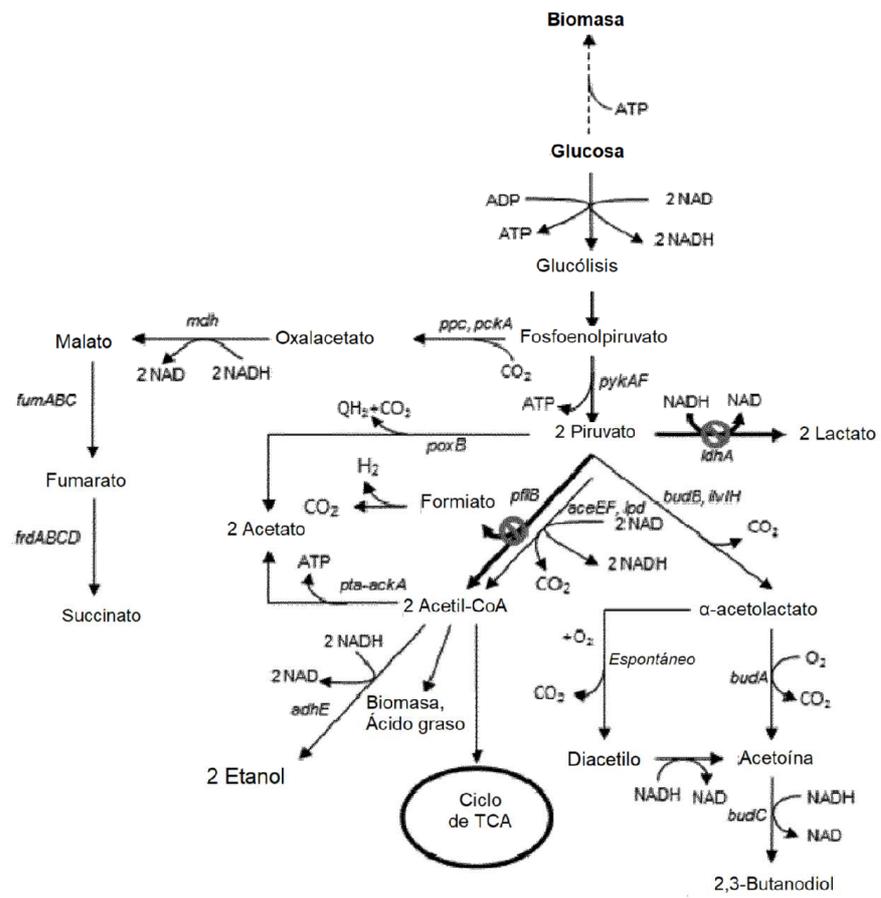


Fig.2

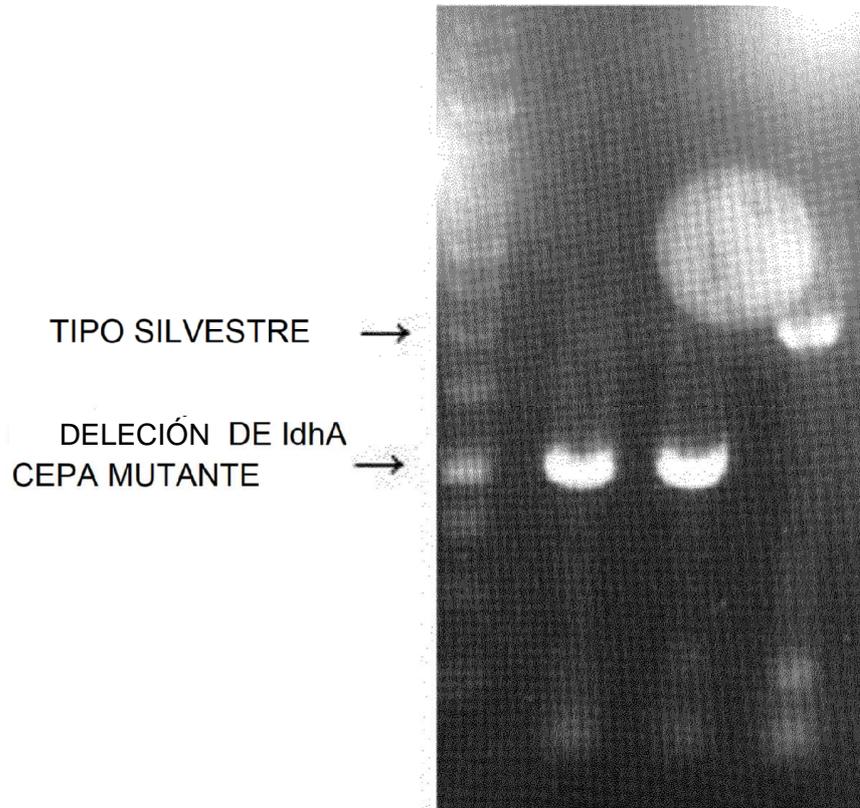


Fig.3

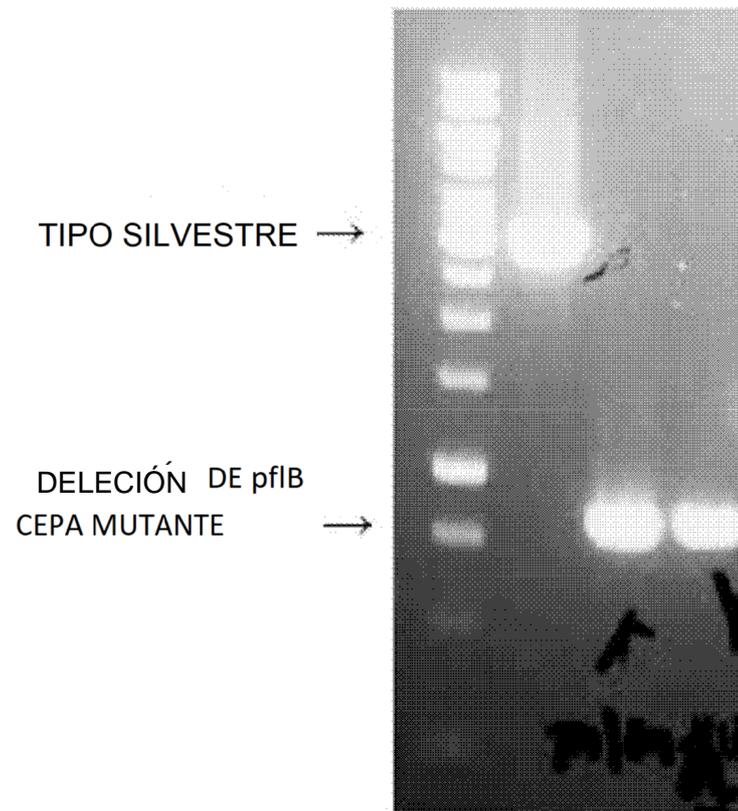


Fig.4

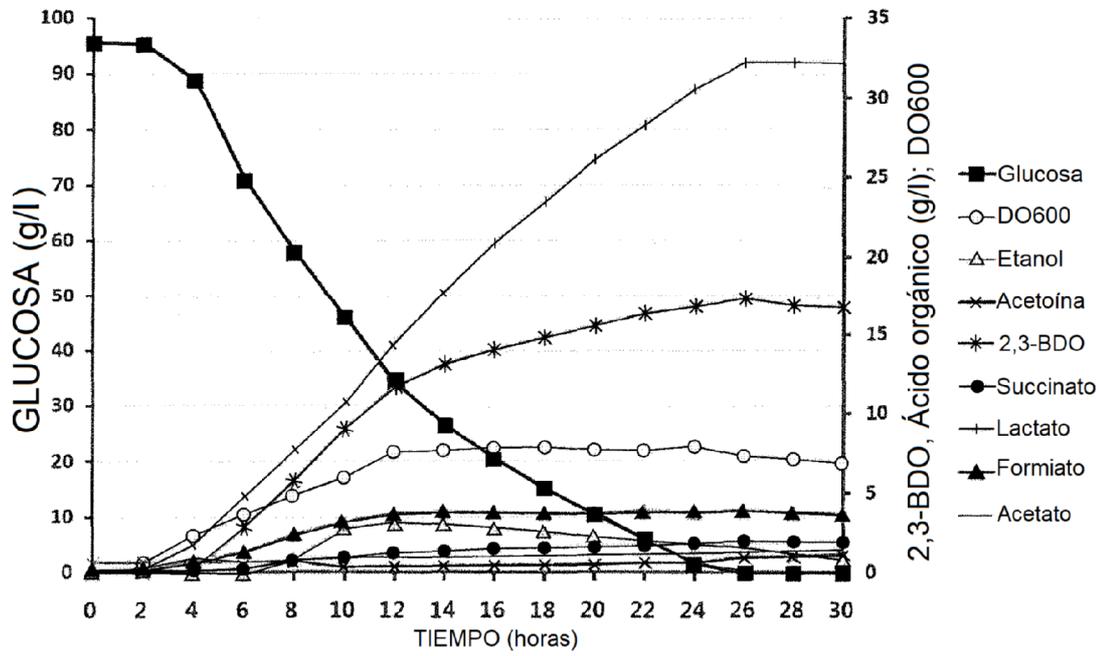


Fig.5

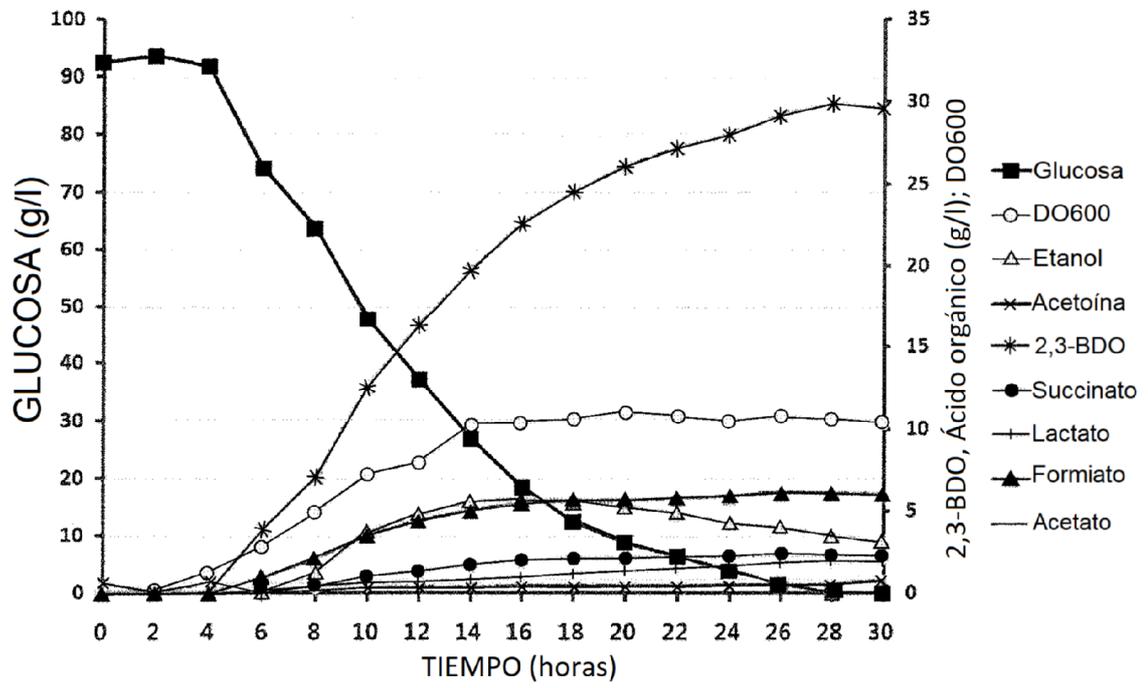


Fig.6

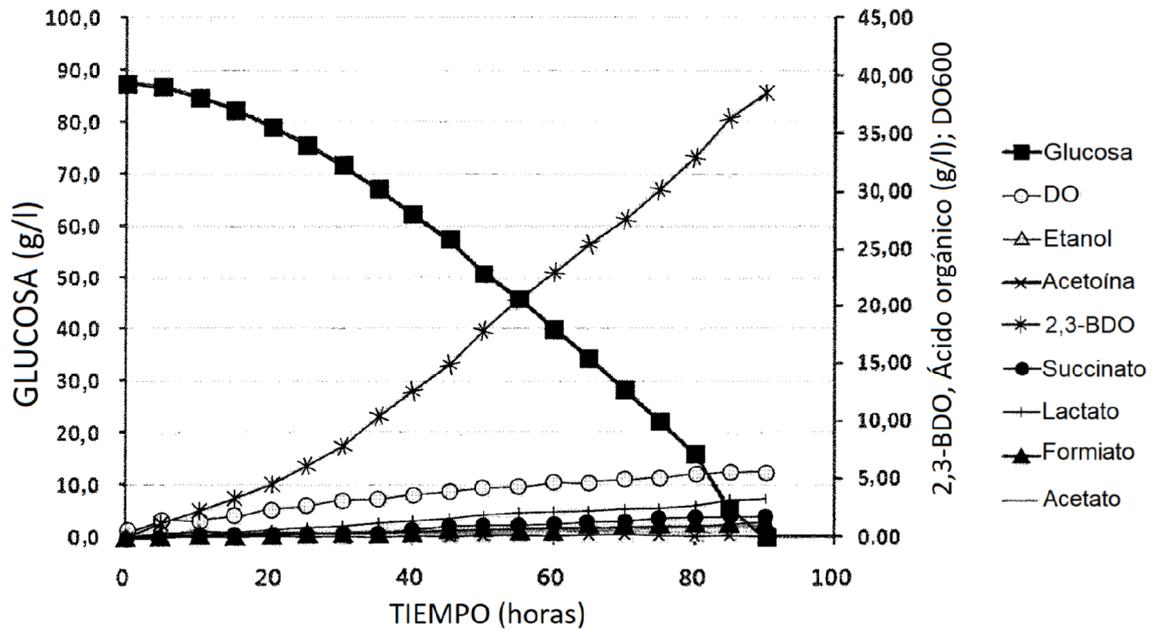


Fig.7

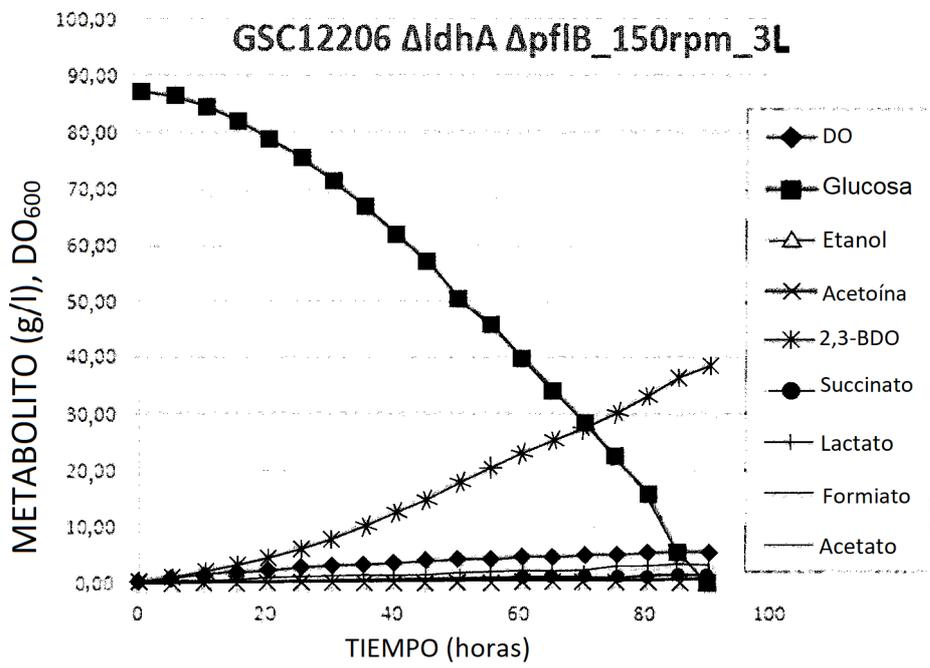


Fig.8

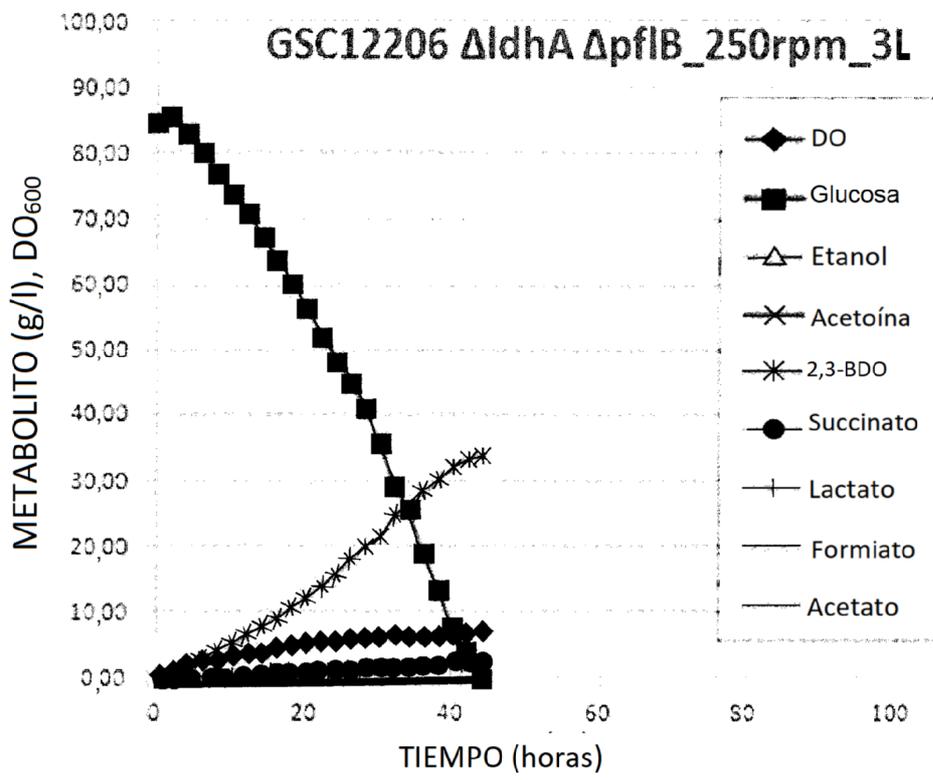


Fig.9

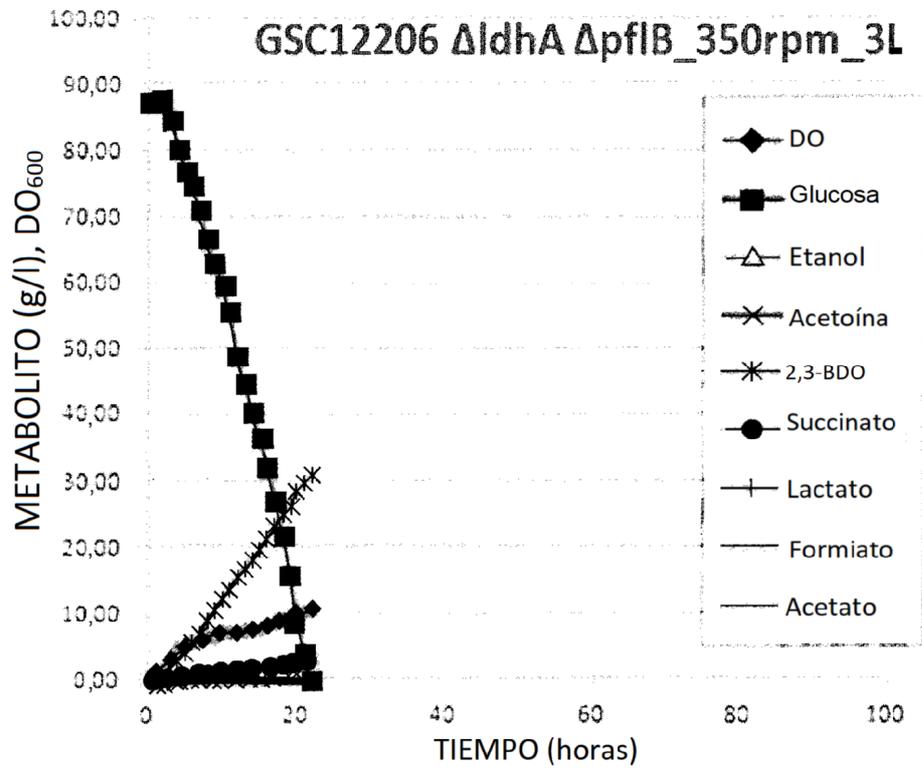


Fig.10

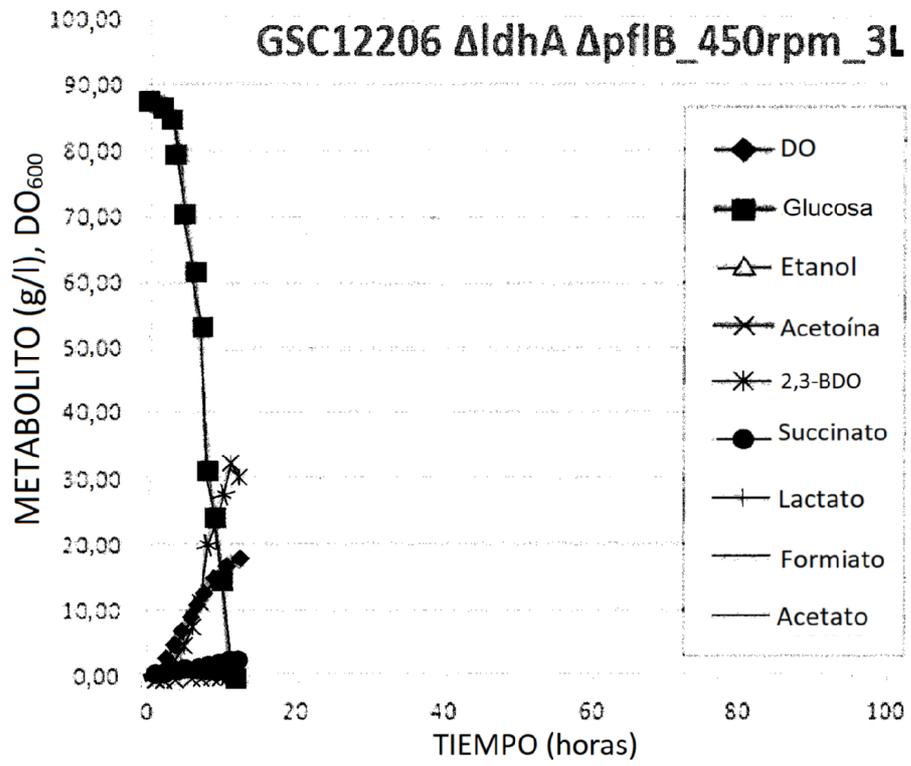


Fig.11

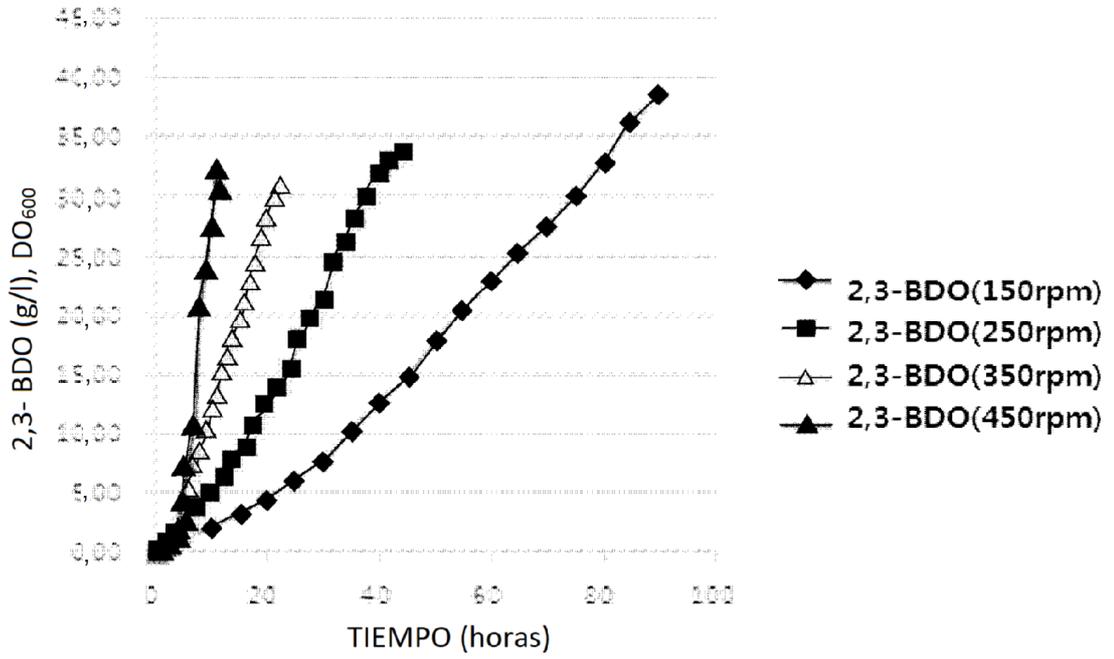


Fig.12

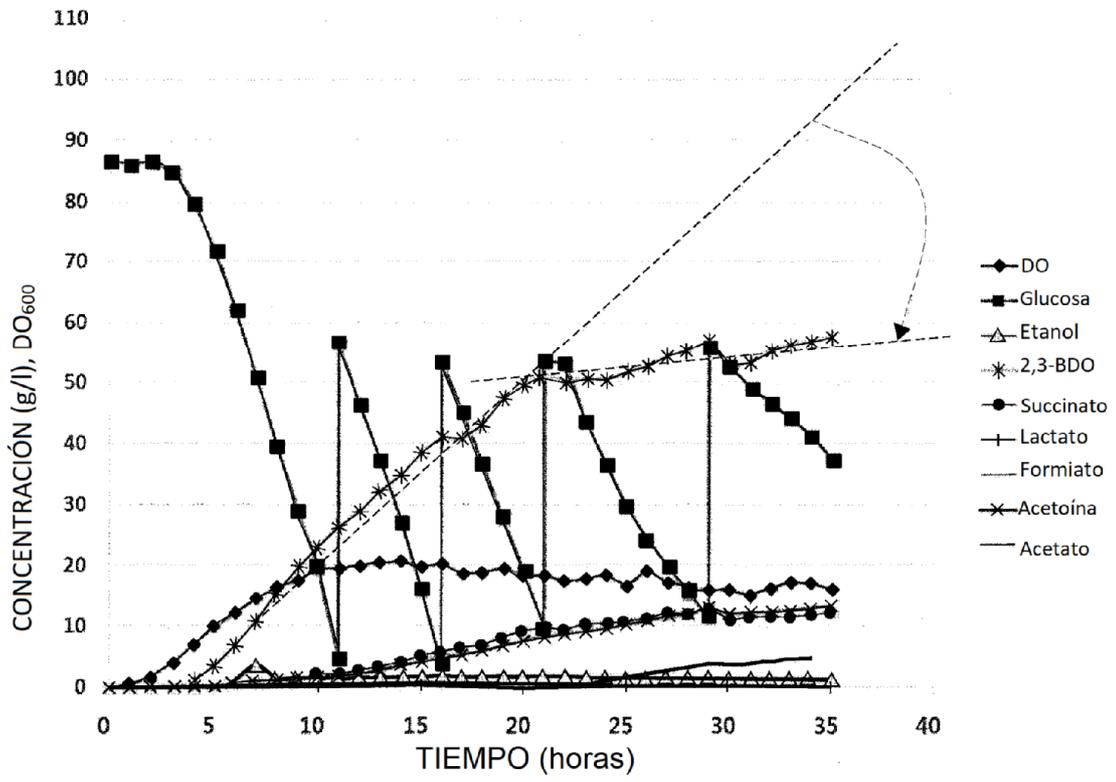


Fig.13

