

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 541 538**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2005 E 05857107 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1838837**

(54) Título: **Microorganismos recombinantes para una mayor producción de ácidos orgánicos**

(30) Prioridad:

**22.12.2004 US 639443 P
26.01.2005 US 647141 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2015

(73) Titular/es:

**THE MICHIGAN BIOTECHNOLOGY INSTITUTE
(100.0%)
3815 Technology Boulevard
Lansing, Michigan 48910, US**

(72) Inventor/es:

**YI, JIAN;
KLEFF, SUSANNE y
GUETTLER, MICHAEL V.**

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 541 538 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

Microorganismos recombinantes para una mayor producción de ácidos orgánicos

Declaración respecto al apoyo del Gobierno de Estados Unidos

5 La presente invención se llevó a cabo con el apoyo del Gobierno de Estados Unidos a tenor del Acuerdo de Cooperación Nº. DE-FC36-02GO12001 otorgado por el Departamento de Energía. El Gobierno de Estados Unidos tiene determinados derechos sobre la presente invención.

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

10 La presente solicitud reivindica beneficio a tenor de 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional de Estados Unidos Nº. 60/647.141, presentada el 26 de enero de 2005; y de la solicitud provisional de Estados Unidos Nº. 60/639.443, presentada el 22 de diciembre de 2004.

Antecedentes

15 Se podrían producir muchas sustancias químicas que actualmente proceden de materiales petroquímicos a partir de carbohidratos de origen natural. En particular, ácido succínico, un ácido dicarboxílico de cuatro carbonos, tiene el potencial de convertirse en una sustancia química de mercancía de elevado volumen que se podría usar como material de partida para procesos comerciales que producen un intermedio importante y sustancias químicas de especialidad para las industrias de productos para consumo y que actualmente se basan en materiales de partida procedentes de materias químicas no renovables. Por ejemplo, como sustancia química de mercancía, el ácido succínico podría sustituir a materiales de partida petroquímicos usados en la producción de compuestos de 1,4-butanodiol (BDO) y tetrahidrofurano (THF), que son útiles como disolventes y materiales de partida para muchas industrias. Por ejemplo, 20 los compuesto de BDO y THF son útiles para producir resinas para cuerpos de automóvil, termoplásticos para su uso en electrodomésticos, y polímeros elásticos tales como Lycra™ en la industria textil. Además, los compuestos de BDO y THF también tiene muchos usos de especialidad en las industrias agroquímica y farmacéutica. Notablemente, cabe esperar un aumento del consumo mundial de BDO a una tasa anual tan elevada como un 4 %.

25 Las sustancias petroquímicas actualmente usadas para producir BDO y THF incluyen acetileno, formaldehído, butano, butadieno y óxido de propileno. Todos estos tienen diversas propiedades peligrosas, tales como inflamabilidad extrema, inestabilidad química y toxicidad. Además, debido a que estos materiales proceden de petróleo, agotan un recurso no renovable, y tras eliminación o destrucción, finalmente liberan carbono (en forma de dióxido de carbono) a la atmósfera. De este modo, el desarrollo de ácido succínico como sustitutivo de materiales de procedencia petroquímica, reduciría la manipulación y almacenamiento de materiales peligrosos, mejoraría la seguridad industrial y 30 comunitaria, reduciría la contaminación y los costes ambientales y reduciría la dependencia del petróleo.

35 La producción de ácido succínico y otros compuestos orgánicos por medio de fermentación de azúcares resulta económicamente viable. Se ha usado un número de microorganismos para producir ácido succínico usando azúcares de maíz como fuente de carbono. Como tal, el desarrollo de ácido succínico como sustitutivo de materiales de partida petroquímicos ampliaría los mercados para productos de maíz y otros productos agrícolas y/o biomasa que pueden proporcionar azúcares aptos para fermentación.

40 Formalmente, el mecanismo bioquímico para la producción de ácido succínico añade una molécula de dióxido de carbono al compuesto de tres carbonos de fosfoenolpiruvato (PEP), para producir el compuesto de cuatro carbonos de oxaloacetato (OAA). Las siguientes etapas en el mecanismo de ácido succínico son parte del ciclo de ácido tricarboxílico inverso (ciclo TCA) e incluyen dos etapas de reducción obligadas. En el proceso bioquímico que conduce desde OAA hasta succinato, OAA debe primero reducirse para producir L-malato. Posteriormente, se deshidrata el L-malato para producir fumarato y agua. A continuación, se reduce el fumarato para proporcionar ácido succínico. En las técnicas químicas, "reducción" se refiere a la adición de hidrógeno molecular a un compuesto.

45 Generalmente, no se encuentra hidrógeno molecular libre en los sistemas biológicos intracelulares. En lugar de ello, se lleva a cabo la reducción a través del uso de co-enzimas que funcionan como equivalentes bioquímicos de hidrógeno (es decir, como vehículos de hidrógeno molecular) y se denominan "equivalentes reductores". Los equivalentes reductores incluyen los coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido hidrógeno ("NADH"), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidrógeno ("NADPH"), flavina adenina dinucleótido hidrógeno ("FADH₂" y flavina mononucleótido hidrógeno ("FMNH"). Generalmente, NADH y NADPH pueden interconvertirse en un intervalo de microorganismos por medio de la enzima piridina dinucleótido transhidrogenasa.

50 Los equivalentes reductores requeridos para transformar OAA en succinato se proporcionan por medio de NAD(P)H₂, FADH₂ u otros co-factores. Resulta esencial que una cantidad suficiente de equivalentes reductores se encuentre disponible para la transformación de OAA en succinato. Si no se encuentran disponibles suficientes equivalentes reductores, el mecanismo bioquímico no funciona de manera eficaz, y únicamente una parte de OAA se transforma en el succinato deseado.

Se pueden producir los equivalentes reductores en un número de procesos biológicos que se encuentra de forma común en el metabolismo celular. Por ejemplo, se pueden generar los equivalentes reductores en el ciclo de pentosa fosfato (PPC). En el PPC, se convierte la glucosa-6-fosfato en D-6-fosfo-glucono- δ -lactona por medio de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que también se conoce como enzima de Zwischenferment o Zwf. Como parte de la presente conversión, se convierte NADP en NADPH como aceptor de equivalentes reductores.

Se han descrito pocos microorganismos que produzcan suficientes concentraciones de ácido succínico para la producción comercial. Un de los citados microorganismos es *Actinobacillus succinogenes*, un organismo anaerobio facultativo que se aisló a partir de rumen bovino. Este organismo produce una elevada concentración de ácido succínico y tolera una eleva concentración de azúcar. *Actinobacillus succinogenes* es uno de los productos mejores conocidos de ácido succínico, pero los rendimientos fermentados de esta cepa pueden estar limitados por la ausencia de equivalentes reductores. El documento WO 2004/003175 se refiere a la sobre-expresión del gen zwf de E. coli para producir amino ácidos. Además, el presente documento no está relacionado con el desarrollo de microorganismos para producir ácido succínico. De hecho, aunque el documento WO 2004/003175 muestra la transformación de E. coli con el gen zwf, el presente documento únicamente muestra que daría como resultado una mayor proliferación celular.

No existen consideraciones algunas acerca de la sobre-expresión del gen zwf en otros microorganismos o sobre la producción aumentada de ácido succínico en el documento WO 2004/003175. KIM PIL ET AL: "Construcción de un vector de lanzadera para la sobre-expresión de proteínas recombinantes en Actino-bacilo *succinogenes*." PLASMID, vol. 51, nº. 2, Marzo 2004 (2004-03), páginas 108-115, XP009109260 ISSN: 0147-619X divulga una cepa recombinante de *A. succinogenes*, que sobre-expresa proteínas recombinantes bajo el control del promotor de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de *A. succinogenes*. De nuevo, no existen consideraciones algunas en el presente documento con respecto a la sobre-expresión del gen zwf y una mayor producción de ácido succínico.

Sumario

Se divultan microorganismos recombinantes para producir ácidos orgánicos. El microorganismo recombinante es una cepa recombinante de un microorganismo productor de ácido succínico, habiéndose transformado dicho microorganismo con al menos un polinucleótido que codifica una enzima zwf y que está ligado de forma operativa a una secuencia de promotor, en el que la secuencia de ARNr 16S del microorganismo tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16 S de Actino-bacilo *succinogenes*.

Normalmente, el microorganismo recombinante es capaz de producir uno o ácido succínico en un nivel apropiado para producción comercial. El microorganismo recombinante es un microorganismo productor de ácido succínico. Por ejemplo, los microorganismos pueden producir ácido succínico en una concentración apropiada para la producción comercial. Una concentración apropiada para producción comercial puede ser de al menos aproximadamente 20 g/l, 40 g/l, 60 g/l, 80 g/l, 100 g/l, 120 g/l, y/o 140 g/l. De manera deseable, el microorganismo recombinante es capaz de producir ácido succínico en concentraciones de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 130 g/l.

El microorganismo recombinante puede estar seleccionado y sometido a estudio técnico recombinante para tolerar concentraciones relativamente elevadas de ácido succínico con el fin de facilitar la producción de ácido succínico a una concentración apropiada para la producción comercial en un sistema de fermentación. En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden estar seleccionados para producir cantidades relativamente reducidas de sub-productos no deseados tales como acetato, formiato y/o piruvato (por ejemplo, no más de aproximadamente 2,0 g/l de acetato, no más de aproximadamente 2,0 g/l de formiato y/o no más de aproximadamente 3,0 g/l de piruvato). El microorganismo recombinante puede proceder de una cepa (o una variante de una cepa) que es resistente de los niveles de monofluoroacetato de sodio a una concentración de aproximadamente 1 g/l, 2 g/l, 4 g/l y/o 8 g/l. En otra realización, una variante de microorganismo recombinante puede estar seleccionada para ser resistente a los niveles de monofluoroacetato de sodio a una concentración de al menos 1 g/l, 2 g/l, 4 g/l y/o 8 g/l.

En una realización, el microorganismo recombinante procede de una cepa de *Actinobacillus succinogenes* (i.e., "*A. succinogenes*") o un microorganismo relacionado con *Actinobacillus succinogenes*. Una cepa apropiada de *A. succinogenes* es Bacteria 130Z depositada en American Type Culture Collection (ATCC), con el Número de Acceso ATCC 55618. Véase el documento U.S. 5.504.004 para la descripción de la Bacteria 130Z y otras cepas apropiadas.

Se pueden seleccionar otros microorganismos apropiados para la preparación del microorganismo recombinante y pueden incluir microorganismos que están relacionados con *A. succinogenes* tal y como viene determinado por medio de la identidad de secuencia con ARNr 16S. Por ejemplo, un microorganismo relacionado con *A. succinogenes* puede tener ARNr 16S que exhiba una identidad de secuencia sustancial frente a ARNr 16S de *A. succinogenes* (es decir, un microorganismo que tenga ARNr 16S que exhiba al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia frente a ARNr 16S de *A. succinogenes* o más idoneidad, que exhiba al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia frente a ARNr 16S de *A. succinogenes*).

Muchos microorganismos representativos de la familia Pasteurellacea tienen ARNr 16S que exhibe al menos un 90 % de identidad de secuencia frente a ARNr 16S de *A. succinogenes*. Por ejemplo, véase Guettler et al., INT'L J. SYSTEMATIC BACT. (1999), 49, 207-216 en página 209, Tabla 2. Los microorganismos apropiados pueden incluir microorganismos tales como Taxón de Bisgaard 6 y Taxón de Bisgaard 10.

En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante puede prepararse a partir de organismos diferentes de *A. succinogenes*. Por ejemplo, el microorganismo recombinante se puede preparar a partir de cualquier microorganismo que resulta apropiado para su uso en sistemas de fermentación para producir ácidos orgánicos. Un microorganismo apropiado puede incluir *E. coli*. Las cepas apropiadas de *E. coli* se conocen en la técnica.

- 5 Las variantes de los microorganismos que son resistentes a monofluoroacetato de sodio también pueden resultar apropiadas para la preparación del microorganismo recombinante. Por ejemplo, véase el documento U.S. 5.521.075 y el documento U.S. 5.573.931. En una realización, el microorganismo recombinante se prepara a partir de una variante de *A. succinogenes* que es resistente frente al menos aproximadamente 1 g/l de monofluoroacetato de sodio. Una variante apropiada es FZ45. Véase el documento U.S. 5.573.931. El microorganismo recombinante depositado con el Número de Acceso ATCC PTA-6255, procede de una variante de *A. succinogenes* que es resistente a al menos aproximadamente 1 g/l de monofluoroacetato de sodio (i.e., FZ45).

10 El microorganismo recombinante se transforma con polinucleótido que codifica una enzima Zwf. De manera deseable, el polinucleótido codifica un polipéptido que facilita la conversión de NADP en NADPH. El polinucleótido o polipéptido puede ser endógeno frente al microorganismo procedente de un gen o enzima normalmente presente en el 15 microorganismo. En algunas realizaciones, el polinucleótido o el polipéptido puede ser un homólogo a un gen endógeno o enzima del microorganismo. En otras realizaciones, el polinucleótido o polipéptido puede ser heterólogo (es decir, procedente de un gen o enzima normalmente no presente en el microorganismo o procedente de una fuente diferente del microorganismo).

20 El microorganismo recombinante puede expresar una variante del polinucleótido que codifica el polipéptido y/o una variante del polipéptido. Una variante del polipéptido puede incluir un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia frente al polinucleótido, o de manera deseable, al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia frente al polinucleótido que codifica la enzima Zwf. Una variante puede incluir un polipéptido que tenga al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia frente al polipéptido, o de manera deseable, al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia frente al polipéptido que codifica la enzima Zwf. Como tal, los polinucleótidos apropiados pueden incluir polinucleótidos que codifican un péptido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ. Nº. ID. 1.

25 El microorganismo recombinante se transforma con un polinucleótido que expresa una enzima Zwf, y exhibe una actividad enzimática Zwf más elevada que un microorganismo que no se haya transformado con un polinucleótido que expresa un polipéptido que tenga actividad enzimática Zwf. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante exhibe al menos aproximadamente cinco veces (5x) más actividad enzimática Zwf, (o de manera deseable aproximadamente diez veces (10x) más actividad enzimática Zwf, o de manera más deseable al menos 30 aproximadamente cincuenta veces (50x) más actividad enzimática Zwf) que un microorganismo que no ha sido transformado con un polipéptido que tenga una actividad enzimática Zwf. La actividad enzimática Zwf puede incluir actividad NADP reductasa. Se puede determinar la actividad enzimática Zwf por medio de medición del nivel de NADPH presente en el microorganismo recombinante (por ejemplo, en comparación con un microorganismo que no haya sido transformado con un polinucleótido que exprese un polipéptido que tenga actividad enzimática Zwf).

35 El microorganismo recombinante puede expresar un polinucleótido que codifica una enzima Zwf tal como un gen Zwf. Una variante del polinucleótido puede comprender un polinucleótido que tenga al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia frente a un gen Zwf, al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia frente a un gen Zwf y que codifica un polipéptido que tenga una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf. Una variante de un polinucleótido puede incluir un fragmento de ácido nucleico del polinucleótido. Por ejemplo, un fragmento puede incluir al menos aproximadamente un 90 % de un gen Zwf, o al menos aproximadamente un 95 % de un gen Zwf. Un fragmento de ácido nucleico puede ser de cualquier longitud apropiada. Por ejemplo, el fragmento de ácido nucleico 45 puede comprender al menos aproximadamente 10, 50, 100, 250, 500, 1000 y/o 1400 nucleótidos. Un fragmento puede codificar un polipéptido que tenga una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf.

50 Los genes Zwf apropiados incluyen genes Zwf endógenos o nativos frente al microorganismo recombinante (es decir, genes Zwf normalmente presentes en el microorganismo del cual procede el microorganismo recombinante) o sus variantes. Otros genes Zwf apropiados pueden incluir los genes Zwf heterólogos frente al microorganismo (es decir, genes Zwf normalmente no presentes en, u obtenidos a partir de fuentes diferentes del microorganismos usado para preparar el microorganismo recombinante) o sus variantes. Los genes de Zwf apropiados pueden incluir variantes que tienen al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de polinucleótido del gen Zwf seleccionado (preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia frente a la secuencia de polinucleótido del gen Zwf seleccionado) y que codifica un polipéptido que tiene una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf (es decir, actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y/o actividad NADP reductasa).

55 Los genes Zwf apropiados pueden incluir el gen Zwf de *E. coli* o sus variantes. La secuencia de polinucleótido del gen *E. coli* se deposita en GenBank con el número de acceso NC_000913, complemento inverso de los nucleótidos 1.932.863 y 1.934.338 (SEQ. Nº. ID: 1) y el número de acceso M55005, nucleótidos 708 a 2180 (SEQ. Nº. ID: 2). Las variantes apropiadas del gen de *E. coli* pueden incluir un polinucleótido que tenga al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia (de manera deseable al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia)

frente a la SEQ. Nº. ID: 1 (o SEQ. Nº. ID: 2) del polinucleótido, tal como el polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf (es decir, actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y/o actividad NADP reductasa).

5 Los genes Zwf apropiados pueden incluir el gen Zwf de *A. succinogenes* o sus variantes. La secuencia genoma de
borrador para *A. succinogenes* 130Z se ha establecido recientemente y se ha acoplado y se encuentra públicamente
disponible como Septiembre 2005, en la página web del Joint Genome Institute, Departamento de Energía. El gen Zwf
se anota como "glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa" y está presente en los nucleótidos 8738-10225 contig 115 (es
decir, SEQ NO ID:5). La secuencia de amino ácido predicha del polipéptido codificado (es decir., la enzima Zwf de *A.*
succinogenes) se presenta como SEQ NO ID:6. La enzima Zwf exhibe un 43 % de identidad de secuencia de amino
ácidos y un 60 % de homología de amino ácido frente a la enzima Zwf de *E.coli* usando el algoritmo de alineación
"BLAST" versión BASTP 2.2.12, matriz BLOSUM62, disponible en la página web del National Center for Biotechnology
Information. Variantes apropiadas de *A. succinogenes*. El gen Zwf puede incluir un polinucleótido que tenga al menos
aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia (de manera deseable al menos aproximadamente un 95 % de
identidad de secuencia) frente al polinucleótido de SEQ. NO. ID: 5, de forma que el polinucleótido codifica un
10 polipéptido que tiene una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf (es decir, actividad glucosa-6-fosfato
deshidrogenasa y/o actividad NADP reductasa).

15 El microorganismo recombinante puede expresar cualquier enzima Zwf endógena (es decir, una enzima Zwf presente
dentro del microorganismo a partir del cual se obtiene el microorganismo recombinante) o sus variantes. En otras
realizaciones, el microorganismo recombinante puede expresar una enzima Zwf que sea heteróloga frente al
20 microorganismo (es decir, una enzima Zwf que no esté presente o se exprese en el microorganismo a partir del cual
procede el microorganismo recombinante) o sus variantes. Enzimas Zwf apropiadas pueden incluir variantes de al
menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de amino ácido frente a la secuencia de amino ácidos de
una enzima Zwf seleccionada (de manera deseable al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de
25 amino ácido frente a la enzima Zwf seleccionada) y que tenga una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf
(por ejemplo, actividad NADP reductasa y/o actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Las enzimas Zwf apropiadas
pueden incluir la enzima Zwf de *E.coli* (por ejemplo, SEQ. NO. ID: 3, polipéptido codificado por el complemento inverso
de una secuencia de nucleótidos 1.932.863 hasta 1.934.338 de NC_000913 o sus variantes, y *A. succinogenes*.
Enzima Zwf (por ejemplo, SEQ NO ID:6) o sus variantes.

30 Un polipéptido de variante puede incluir un fragmento de una enzima Zwf. Por ejemplo, un fragmento puede incluir al
menos aproximadamente un 90 % de secuencia de amino ácido de la SEQ NO ID:3, o de manera más deseable al
menos aproximadamente un 95 % de la secuencia de amino ácidos SEQ. NO ID: 3. En otras realizaciones, un
fragmento puede incluir al menos aproximadamente un 90 % de la secuencia de amino ácidos de SEQ. NO ID: 6 o, de
manera más deseable, al menos aproximadamente un 95 % de la secuencia de amino ácidos SEQ. NO ID: 6. Un
35 fragmento de polipéptido puede tener cualquier longitud deseada. Por ejemplo, el fragmento de polipéptido puede
comprender al menos aproximadamente 10, 50, 100, 200 y/o 300 amino ácidos (por ejemplo, de SEQ NO ID:3 o SEQ
NO ID:6). Normalmente, un fragmento de polipéptido tiene una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf.

40 El microorganismo recombinante puede incluir un ácido succínico que produce un microorganismo que se ha
transformado con un polinucleótido que expresa un gen Zwf endógeno (es decir, nativo) que codifica una enzima Zwf
endógena (es decir, nativa). En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante puede incluir un
microorganismo que produce ácido succínico que se ha transformado con un polinucleótido que expresa un gen Zwf
heterólogo que codifica una enzima Zwf heteróloga. El microorganismo recombinante depositado con el American
Type Culture Collection (ATCC) bajo el Número de Acceso ATCC PTA-6255, es una cepa recombinante de
45 microorganismo productor de ácido succínico (es decir, *A. succinogenes*.) que expresa un gen Zwf heterólogo (por
ejemplo, el gen Zwf de *E. coli*) que codifica una enzima Zwf heteróloga.

50 El microorganismo recombinante puede expresar un polipéptido que tiene una actividad enzimática Zwf a niveles
relativamente elevados (es decir, el polipéptido se puede "sobre-expresar"). Por ejemplo, el microorganismo
recombinante puede expresar una enzima Zwf endógena con niveles relativamente elevados, en comparación con un
microorganismo no recombinante. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante puede transformarse
con una molécula de ADN (por ejemplo, un plásmido) que exprese una enzima Zwf endógena con niveles
55 relativamente elevados, en comparación con un microorganismo recombinante que no se haya transformado con la
molécula de ADN.

60 Se puede optimizar un polinucleótido, tal como un gen Zwf, para la expresión en un microorganismo seleccionado a
partir del cual se obtiene el microorganismo recombinante. Por ejemplo, se puede optimizar un gen Zwf heterólogo
para la expresión en un microorganismo no nativo. En algunas realizaciones, se puede optimizar un gen Zwf para la
expresión en *A. succinogenes*., o en un microorganismo tal como Taxón de Bisgaard 6 o Taxón de Bisgaard 10. En
otras realizaciones, el gen Zwf puede optimizarse para la expresión en *E. coli*.

65 Se puede optimizar un polinucleótido tal como un gen Zwf para la expresión en el microorganismo recombinante por
medio de cualquier estrategia apropiada. Por ejemplo, se puede optimizar el gen Zwf para la expresión en el
microorganismo recombinante por medio de unión del gen Zwf a una secuencia de promotor que facilite la expresión
del gen Zwf en el microorganismo recombinante. Se puede optimizar la secuencia de promotor para facilitar niveles

- relativamente elevados de expresión en el microorganismo recombinante (es decir, se puede optimizar para facilitar la "sobre-expresión"). De manera operativa, se puede unir el gen Zwf a una secuencia de promotor que sea endógena frente al microorganismo (es decir, un promotor nativo para el microorganismo) o heteróloga frente al microorganismo (es decir, un promotor que normalmente no esté presente en, o proceda de una fuente diferente del microorganismo). Los promotores apropiados pueden incluir promotores que no sean un promotor nativo para el gen Zwf seleccionado (es decir, un promotor de gen Zwf, que puede ser endógeno frente al microorganismo o heterólogo frente al microorganismo). Los promotores apropiados pueden incluir promotores aptos para inducción o promotores constitutivos. Los promotores apropiados pueden proceder de promotores de microorganismos productores de ácido succínico.
- 10 En otras realizaciones, la expresión de un gen Zwf se puede optimizar a nivel translacional. Por ejemplo, se puede modificar un gen Zwf heterólogo para que incluya códones que demuestran una frecuencia de uso preferida en el microorganismo a partir del cual se obtiene el microorganismo recombinante en forma de hospedador no natural para el gen.
- 15 En otra realización, se puede optimizar la expresión de un polinucleótido tal como un gen Zwf proporcionando un número de copias relativamente elevado del polinucleótido en el microorganismo recombinante. Por ejemplo, el gen Zwf puede estar presente sobre un elemento epigenético que sea capaz de replicar para lograr un número de copias relativamente elevado en el microorganismo recombinante (por ejemplo, un plásmido).
- 20 En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante es una cepa recombinante de un microorganismo productor de ácido succínico, tal como *Actinobacillus succinogenes* o microorganismo relacionados, que se ha transformado con una molécula de ADN que incluye un promotor unido operativamente a un gen Zwf. El gen Zwf puede proceder de un gen Zwf endógeno o heterólogo y puede incluir, por ejemplo, el gen Zwf de *A. succinogenes* (por ejemplo, la SEQ NO ID:5) y el gen Zwf de *E. coli* (por ejemplo, los SEQ NOs ID: 1 y 2). Se conocen otros genes Zwf y se han publicado sus secuencias de polinucleótidos (Véase, por ejemplo, GenBank). Las secuencias de promotor engógeno o nativo apropiado de microorganismos productores de ácido succínico pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de promotor fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa. La secuencia de promotor de fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa de *A. succinogenes* se deposita en GenBank con el número de acceso AY308832, nucleótidos 1-258 (SEQ. NO ID: 4). Un promotor de fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa puede ser un promotor de heterólogo apropiado para un gen Zwf (es decir, un promotor de gen que no sea Zwf).
- 25 Como se ha descrito en la presente memoria, un microorganismo recombinante puede incluir una molécula de ADN recombinante como elemento epigenético y/o la molécula de ADN recombinante se puede incorporar en el genoma del microorganismo (por ejemplo, por medio de procedimientos apropiados de recombinación). En determinadas realizaciones, la molécula de ADN es un plásmido, un bacteriófago recombinante, un cromosoma artificial bacteriano (BAC) y/o un cromosoma artificial P1 de *E. coli* (PAC). La molécula de ADN puede incluir un marcador que se puede escoger. Los marcadores apropiados que se pueden escoger pueden incluir marcadores para resistencia frente a canamicina, resistencia frente a ampicilina, resistencia frente a tetraciclina, resistencia frente a cloranfenicol y combinaciones de estos marcadores que se pueden escoger. En una realización, el marcador que se puede escoger es de resistencia frente a canamicina.
- 30 Como se describe en la presente memoria, un molécula de ADN recombinante puede incluir un promotor operativamente apropiado ligado a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una o más actividades bioquímicas de enzima Zwf para expresar el polinucleótido en un microorganismo recombinante (por ejemplo., *A. succinogenes*). El promotor puede resulta apropiado para expresar el polipéptido en un microorganismo productor de ácido succínico. En algunas realizaciones, la molécula de ADN recombinante incluye un promotor de fosfoenol piruvato (PEP) carboxiquinasa (por ejemplo, un promotor de fosfoenol piruvato (PEP) carboxiquinasa de *A. succinogenes*) ligado operativamente a un gen Zwf o una de sus variantes, (que puede incluir un gen Zwf heterólogo tal como un gen Zwf de *E. coli* o un gen Zwf de *A. succinogenes*). Por ejemplo, la molécula de ADN puede incluir nucleótidos 1-258 de la secuencia de ADN depositada con el número de acceso de GenBank AY308832 (SEQ. NO. ID: 4) o una de sus variantes, ligado operativamente al complemento inverso de los nucleótidos 1.932.863 a 1.934.338 de la secuencia de ADN depositada con el número de acceso de GenBank NC_000913 (SEQ. NO ID: 1) o ligado operativamente a la secuencia de ADN depositada con el número de acceso de GenBank M55005 (SEQ. NO ID: 2) o ligado operativamente a la secuencia de ADN de SEQ. NO ID: 5. En algunas realizaciones, el promotor puede incluir un polinucleótido que tenga al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con respecto al polinucleótido de SEQ. NO ID: 4 y que tiene una actividad de promotor en el microorganismo recombinante.
- 35 Un microorganismo recombinante que comprende la molécula de ADN recombinante puede resultar apropiada para producir ácido succínico en un sistema de fermentación. El microorganismo recombinante que comprende la molécula de ADN recombinante puede producir niveles mejorados de ácido succínico en un sistema de fermentación con respecto a un microorganismo que no comprende la molécula de ADN recombinante.
- 40 El plásmido de ADN puede comprender una o más de las moléculas de ADN recombinante anteriormente mencionadas. El plásmido de ADN puede incluir un marcador que se puede escoger. Los marcadores apropiados que se pueden escoger pueden incluir uno o más genes para resistencia frente a ampicilina, resistencia frente a estreptomicina, resistencia frente a canamicina, resistencia frente a tetraciclina, resistencia frente a cloranfenicol y
- 45
- 50
- 55
- 60

resistencia frente a sulfonamida, ligados operativamente a un promotor apropiado (por ejemplo, un promotor constitutivo). En una realización, el plásmido de ADN incluye el gen para resistencia frente a canamicina.

El plásmido de ADN puede incluir secuencias que se requieren para mantener y/o sustituir el plásmido en una o más células hospedadoras apropiadas. En una realización, el plásmido de ADN capaz de funcionar como vector de lanzadera entre las células hospedadoras apropiadas. El plásmido de ADN puede ser capaz de funcionar como vector de lanzadera entre *A. succinogenes* y *E. coli*.

Una células de hospedador puede incluir una o más moléculas de ADN anteriormente mencionadas. Por ejemplo, la célula hospedadora puede comprender un plásmido de ADN que incluye la molécula de ADN. La célula hospedadora puede resultar apropiada para producir y aislar un plásmido de ADN que incluya la molécula de ADN.

La célula hospedadora puede resultar apropiada para producir uno o más ácidos orgánicos en un sistema de fermentación. En algunas realizaciones, la célula hospedadora expresa un gen Zwf (y posteriormente una enzima Zwf) en un nivel apropiado para mejorar la producción de ácido succínico en un sistema de fermentación. En algunas realizaciones, la célula hospedadora puede expresar un gen Zwf (y posteriormente una enzima Zwf) en un nivel apropiado para mejorar la concentración de equivalentes reductores (por ejemplo, NADPH) en la célula hospedadora.

La célula hospedadora puede comprender una cepa recombinante de *A. succinogenes* que expresa un gen Zwf (y posteriormente una enzima Zwf) en un nivel apropiado para mejorar la concentración de equivalentes reductores (por ejemplo, NADPH) en la cepa. Dicha cepa puede resultar apropiada para producir niveles mejorados de ácido succínico en un sistema de fermentación con respecto a una cepa que no comprenda la molécula de ADN recombinante.

En algunas realizaciones, la células hospedadora es capaz de producir ácido succínico en concentraciones de al menos aproximadamente 20 g/l, 40 g/l, 60 g/l, 80 g/l, 100 g/l, 120 g/l, 140 g/l y/o 160 g/l (por ejemplo, en un sistema de fermentación).

En determinadas realizaciones, la célula hospedadora es capaz de producir ácido succínico en concentraciones de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 130 g/l. De manera deseable, la célula de hospedador no produce ácidos orgánicos seleccionados diferentes de ácido succínico en concentraciones sustanciales. Cuando la célula hospedador produce ácidos orgánicos diferentes de ácido succínico (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido pirúvico y sus mezclas), de manera deseable, los ácidos orgánicos diferentes de ácido succínico se producen en concentraciones no mayores de aproximadamente 30 g/l, de manera deseable no mayores de aproximadamente 20 g/l, de manera deseable no mayores de aproximadamente 10 g/l, e incluso de manera más deseable no mayores de aproximadamente 5 g/l.

Se pueden usar los microorganismos recombinantes anteriormente mencionados en los procedimientos que incluye fermentación de un medio de nutriente para producir uno o más ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, los procedimientos pueden incluir fermentación de un medio de nutriente con un microorganismo recombinante que exprese un gen Zwf (por ejemplo, un gen Zwf de *E. coli*). Los ácidos orgánicos producidos por medio del procedimiento pueden incluir ácido succínico y ácido láctico. En realizaciones adicionales, los procedimientos resultan apropiados para producir ácido succínico en concentraciones de al menos aproximadamente 20 g/l, 40 g/l, 60 g/l, 80 g/l, 100 g/l, 120 g/l, y/o 160 g/l.

En particular, los procedimientos pueden incluir un medio de nutriente con una cepa recombinante de *A. succino-genes* que exprese un gen Zwf (y posteriormente una enzima Zwg) en un nivel apropiado para mejorar la producción de un ácido orgánico (por ejemplo, ácido succínico). El gen Zwf puede incluir un gen Zwf heterólogo. Se deposita una cepa recombinante de *A. succinogenes* que expresa un gen Zwf heterólogo (es decir, el gen Zwf de *E. coli*) con el número de acceso ATCC PTA-6255. En determinadas realizaciones, el microorganismo recombinante es una cepa recombinante de un microorganismo tal como el Taxón de Bisgaard 6 o el Taxón de Bisgaard 10 que expresa un gen Zwf (que puede ser heterólogo) en un nivel apropiado para mejorar la producción de un ácido orgánico (por ejemplo, ácido succínico). Los microorganismos recombinantes apropiados también incluyen cepas recombinantes de *E. coli* que expresan un gen Zwf (que puede ser heterólogo) en un nivel apropiado para mejorar la producción de un ácido orgánico (por ejemplo, ácido láctico).

En el procedimiento, puede resultar deseable fermentar un medio de nutriente con microorganismos recombinantes que producen niveles relativamente elevados de ácidos orgánicos seleccionados, tales como ácido succínico y/o ácido láctico. Como tal, los microorganismos recombinantes seleccionados pueden ser resistentes a niveles elevados de ácidos orgánicos, tales como ácido succínico y/o ácido láctico. Los microorganismos recombinantes pueden también detectarse para producir niveles relativamente bajos de otros sub-productos no deseados. Por ejemplo, el microorganismo recombinante puede producir niveles relativamente bajos de acetato, formiato, piruvato y sus mezclas (por ejemplo, no más de aproximadamente 2,0 g/l, no más de aproximadamente 2,0 g/l de formiato, y/o no más de aproximadamente 3,0 g/l de piruvato). Los microorganismos recombinantes anteriormente descritos que son resistentes a concentraciones de monofluoroacetato de sodio de aproximadamente 1 g/l, 2 g/l, 4 g/l y/o 8 g/l son apropiados para el procedimiento.

En el procedimiento, el medio de nutriente normalmente incluye una fuente de carbono fermentable. Se puede proporcionar una fuente de carbono fermentable por medio de biomasa fermentable. En una realización, la fuente de carbono fermentable procede de una materia prima, incluyendo residuos de cultivos de azúcar, cultivos de almidón y cultivos celulósicos. Generalmente, la fuente de carbono fermentable es un azúcar, tal como glucosa. La fuente de

carbono fermentable también puede incluir alcoholes de azúcar. En realizaciones apropiadas, el procedimiento tiene como resultado un rendimiento de ácido succínico (g) de al menos aproximadamente 100 % con respecto a glucosa (g).

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1: Análisis de flujo metabólico de la fermentación por lotes de la variante FZ45 de *A. succinogenes* usando glucosa.
- Figura 2: Análisis de flujo metabólico de la fermentación por lotes de FZ45/pJR762.73 de *A. succinogenes* FZ45/pJR762.73 usando glucosa.
- 10 Figura 3: Actividades enzimáticas celulares en extractos celulares de cepas transformadas. Se prepararon extractos y se sometieron a ensayo en cuanto a actividad de Zwf como se comenta a continuación. Todas las cepas que transportaban pJR762.73 mostraron aumentos de órdenes de magnitud de la actividad de Zwf, que se representan gráficamente en escala logarítmica.

Descripción detallada de los modos de realización preferentes

- 15 Se divulga en la presente memoria un microorganismo recombinante que es una cepa recombinante de un microorganismo productor de ácido succínico, habiendo sido transformado dicho microorganismo con al menos un polinucleótido que codifica una enzima zwf y que se encuentra ligado de forma operativa a una secuencia de promotor, en el que una secuencia de ARNr 16S del microorganismo tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ARNr 16S de *Actinobacillus succinogenes*. Según se usa en la presente memoria, "microorganismo" incluye cualquier organismo de célula individual apropiado tal como una bacteria, hongos y levadura. Según se usa en la presente memoria, "microorganismo recombinante" significa un organismo que se ha modificado de manera que tiene como resultado un microorganismo que ocurre de forma natural. Un "microorganismo recombinante" puede incluir un microorganismo que ha sido transformado con una molécula de ADN (por ejemplo, una molécula de ADN recombinante).
- 20
- 25 El microorganismo recombinante incluye un microorganismo que se ha transformado con una molécula de ADN que expresa un polipéptido que codifica una enzima Zwf. El ciclo de pentosa fosfato utilizan diversas enzimas que incluyen glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, (también denominada enzima de Zwischenferment o Zwf); una 6-fosfogluconolactonasa; 6-fosfoglucono deshidrogenasa, (también denominada Gnd); ribosa-5-fosfato isomerasa A y B; ribulosa fosfato 3-epimerasas; transacetolasa I y II; y transaldolasa A y B. De estas enzimas, Zwf y Gnd tienen como resultado la producción de dos equivalentes de hidrógeno en forma de NADPH.
- 30 El microorganismo recombinante puede expresar cualquier polipéptido apropiado o una de sus variantes que codifica una enzima Zwf (por ejemplo, actividad de glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa y NADP, actividad de reductasa). Por ejemplo, una enzima Zwf apropiada es la enzima Zwf de *E. coli* o una de sus variantes. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante puede expresar la enzima Zwf en niveles elevados (es decir, "sobre-expresar" la enzima) con respecto a los niveles presentes en los microorganismos no recombinantes.
- 35 El microorganismo recombinante puede expresar una variante de polipéptido que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de amino ácido de una enzima Zwf, y de manera más deseable al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de amino ácido de una enzima Zwf. En realizaciones apropiadas, el microorganismo recombinante puede expresar una variante de una enzima Zwf que tiene al menos aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con respecto a la enzima Zwf. De manera deseable, el polipéptido de variante tiene una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf. Un polipéptido de variante puede incluir un fragmento de la enzima Zwf. Las enzimas Zwf apropiadas incluyen enzima Zwf de *A. succinogenes*, enzima Zwf de *E. coli* y sus variantes.
- 40
- 45 El microorganismo recombinante puede expresar un polinucleótido que codifica una enzima Zwf tal como una enzima Zwf o una de sus variantes. Por ejemplo, el microorganismo recombinante puede expresar un gen Zwf o una de sus variantes que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con respecto al gen Zwf, y de manera más deseable al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con respecto al gen Zwf. En realizaciones apropiadas, el microorganismo recombinante puede expresar una variante del gen Zwf que comprende una secuencia de ADN que tiene al menos aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con respecto al gen Zwf. De manera deseable, el polinucleótido de variante codifica un polipéptido que tiene una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf. Un polinucleótido de variante puede incluir un fragmento del gen Zwf. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante puede expresar un gen Zwf de *A. succinogenes*, un gen Zwf de *E. coli* o una de sus variantes.
- 50
- 55 El microorganismo recombinante puede proceder de cualquier microorganismo apropiado. El microorganismo apropiado es capaz de producir ácido succínico en un nivel apropiado para producción comercial. Según se usa en la presente memoria, un "ácido orgánico" se refiere a "ácido succínico" que puede hacer referencia a "succinato"..."

- Microorganismos apropiados para la preparación de microorganismos recombinantes como se describen en la presente memoria pueden incluir, pero sin limitarse a, miembros del género *Actinobacillus*, incluyendo *A. succinogenes*; Taxón de Bisgaard 6; Taxón de Bisgaard 10; *Mannheimia succiniciproducens*; *E. coli*; *Anaerobiospirillum succiniciproducens*; *Ruminobacter amylophilus*; *Succinivibrio dextrinosolvens*; *Prevotella ruminicola*; *Ralstonia eutropha*; y *coryneform bacteria* (por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium divaricatum*); miembros del género de *Lactobacillus*; levadura (por ejemplo, miembros del género *Saccharomyces*); y cualquier subgrupo. Cualesquiera microorganismos apropiados para la preparación de microorganismos recombinantes, como se describe en la presente memoria, pueden incluir microorganismos que producen ácido succínico.
- 5 [0054] El microorganismo recombinante normalmente expresa una gen Zwf, que puede ser un gen Zwf heterólogo. El gen Zwf se puede optimizar para la expresión del microorganismo recombinante. Por ejemplo, el gen Zwf puede estar ligado operativamente a un promotor que facilita la sobre-expresión del gen en el microorganismo recombinante con respecto a un microorganismo no recombinante. El promotor puede ser endógeno al microorganismo (es decir, nativo con respecto al microorganismo del cual procede el microorganismo recombinante) o heterólogo con respecto al microorganismo (es decir, no nativo con respecto al microorganismo del cual procede el microorganismo recombinante u obtenido a partir de una fuente diferente del microorganismo). El promotor puede ser endógeno al gen Zwf o heterólogo con respecto al gen Zwf (es decir, un promotor de gen que no es Zwf). El promotor puede facilitar la expresión constitutiva y/o inducible del gen Zwf, y/o el promotor puede modificarse para facilitar la expresión constitutiva y/o inducible del gen Zwf por medio de procedimientos apropiados.
- 10 15 [0054] El gen Zwf se puede modificar para facilitar la translación del ARNm correspondiente. Por ejemplo, se puede modificar el gen Zwf para que incluya códones que no están presentes en el gen endógeno o nativo. Estos códones no endógenos pueden estar seleccionados para reflejar la frecuencia de uso del códón en el microorganismo recombinante. Se han desarrollado tablas de uso del codón para muchos microorganismos y se conocen en la técnica. Se puede modificar el gen Zwf para que refleje la frecuencia de uso del códón para *A. succinogenes* como se proporciona a continuación:
- 20 25

Uso de Frecuencia de Codon a modo de ejemplo para *Actinobacillus succinogenes*. Fuente: Liberación de GenBank 144.0 [12 de Noviembre, 2004]

| Triplete [frecuencia por mil] | | | |
|-------------------------------|------------|------------|------------|
| UUU [20,4] | UCU [1,9] | UAU [13,0] | UGU [7,4] |
| UUC [29,7] | UCC [14,8] | UAC [16,7] | UGC [3,7] |
| UUA [35,3] | UCA [13,0] | UAA [1,9] | UGA [0,0] |
| UUG [20,4] | UCG [5,6] | UAG [0,0] | UGG [16,7] |
| | | | |
| CUU [13,0] | CCU [5,6] | CAU [5,6] | CGU [20,4] |
| CUC [1,9] | CCC [0,0] | CAC [7,4] | CGC [9,3] |
| CUA [0,0] | CCA [3,7] | CAA [18,6] | CGA [1,9] |
| CUG [5,6] | CCG [35,3] | CAG [3,7] | CGG [0,0]) |

(continuación)

| Triplete [frecuencia por mil] | | | |
|-------------------------------|------------|------------|-----------|
| AUU [27,8] | ACU [18,6] | AAU [13,0] | AGU [7,4] |
| AUC [22,3] | ACC [31,5] | AAC [39,0] | AGC [3,7] |
| AUA [0,0] | ACA [5,6] | AAA [76,1] | AGA [1,9] |
| AUG [20,4] | ACG [18,6] | AAG [1,9] | AGG [0,0] |

| | | | |
|------------|------------|------------|------------|
| GUU [26,0] | GCU [13,0] | GAU [33,4] | GGU [61,2] |
| GUC [7,4] | GCC [13,0] | GAC [29,7] | GGC [24,1] |
| GUA [11,1] | GCA [22,3] | GAA [64,9] | GGA [0,0] |
| GUG [27,8] | GCG [35,3] | GAG [5,6] | GGG [5,6] |

El microorganismo recombinante puede incluir una cepa recombinante de *A. succinogenes* que expresa un gen Zwf (por ejemplo, un gen Zwf endógeno y/o un gen Zwf heterólogo tal como un gen Zwf de *E.coli*). Otros microorganismos apropiados para producir microorganismos recombinantes incluyen Taxón de Bisgaard 6 (depositado con la Colección de Cultivo, Universidad de Göteborg, Suecia (CGUG), con el número de acceso 15568); Taxón de Bisgaard 10 (depositado con el número de acceso CCUG 15572); y cualquier cepa apropiada de *E. coli* para la cual se conocen muchas cepas en la técnica. El microorganismo recombinante puede proceder de una cepa que produce, niveles elevados de uno o más ácidos orgánicos tales como ácido succínico y ácido láctico, y/o el microorganismo recombinante puede seleccionarse y/o someterse a estudio técnico para producir niveles elevados o mejorados de uno o más ácidos orgánicos tales como ácido succínico y ácido láctico, con respecto a un microorganismo no recombinante.

El microorganismo recombinante puede proceder de cepas que sean resistentes a niveles relativamente elevados de sub-productos no deseados y/o cepas de microorganismos que producen niveles relativamente bajos de sub-productos no deseados. Los sub-productos no deseados pueden incluir formiato (o ácido fórmico), acetato (o ácido acético) y/o piruvato (o ácido pirúvico). Los procedimientos para seleccionar cepas que producen niveles bajos de acetato se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento U.S. 5.521.075 y el documento U.S. 5.573.931. Por ejemplo, las cepas de microorganismos que producen niveles relativamente bajos de acetato pueden estar seleccionadas por medio de cultivo de microorganismos en presencia de un derivado de acetato tóxico, tal como monofluoroacetato de sodio a una concentración de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 8,0 g/l. Las cepas seleccionadas pueden producir niveles relativamente bajos de acetato (por ejemplo, menos de aproximadamente 2,0 g/l), formiato (por ejemplo, menos de aproximadamente 2,0 g/l) y/o piruvato (por ejemplo, menos de aproximadamente 3,0 g/l) en una fermentación de glucosa. Una cepa apropiada resistente a monofluoroacetato para producir un microorganismo recombinante es una cepa de *A. succinogenes* denominada FZ45, que es un derivado de *A. succinogenes* depositado con el número de acceso ATCC 55618. Véase el documento U.S. 5.573.931, que describe procedimientos apropiados para la preparación de cepas microbianas que son resistentes a monofluoro-acetato.

El microorganismo recombinante pueden estar seleccionado y/o sometido a estudio técnico para que sea resistente frente a niveles relativamente elevados de sub-productos no deseados y/o para producir niveles relativamente bajos de sub-productos no deseados. Por ejemplo, tras la transformación, se puede cultivar una población de microorganismos recombinantes en presencia de monofluoroacetato de sodio para seleccionar cepas que sean resistentes a niveles relativamente elevados de acetato y/o cepas que produzcan niveles relativamente elevados de acetato.

Se puede obtener una secuencia de ADN que codifique un polipéptido con una o más actividades bioquímicas de la enzima Zwf por medio del empleo de procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, amplificación PCR de un gen Zwf con primeros apropiados y clonación para dar lugar a un vector de ADN apropiado). Se han divulgado secuencias de polinucleótido de genes Zwf apropiados. (Véase, por ejemplo, GenBank). Por ejemplo, se ha publicado la secuencia de polinucleótido de *A. succinogenes* (SEQ. NO. ID: 5 y 6). (Véase Joint Genome Institute, página web del Departamento de Energía). Se deposita el gen Zwf de *E. coli* Zwf con GenBank (por ejemplo, con Número de Acceso GenBank NC_000913 (SEQ. NO. ID:1) y Número de Acceso GenBank M55005 (SEQ. NO. ID:2)). Se puede obtener el gen Zwf o sus variantes por medio de amplificación PCR de un ADN genómico de microorganismo con primeros apropiados.

El vector de ADN puede ser cualquier vector apropiado para expresar el gen en un microorganismo recombinante. Los vectores apropiados incluyen plásmidos, cromosomas artificiales (por ejemplo, cromosomas artificiales bacterianos) y/o bacteriófagos modificados (por ejemplo, fagémidos). El vector puede diseñarse para que exista en forma de elemento epigenético y/o el vector puede diseñarse para recombinarse con el genoma del microorganismo.

Normalmente, la molécula de ADN incluye un promotor ligado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad enzimática Zwf. El promotor puede ser endógeno o nativo con respecto al microorganismo del cual proceden los microorganismos recombinantes, o heterólogo con respecto al microorganismo (es decir, procedente de una fuente diferente del microorganismo recombinante). Además, el promotor puede ser un promotor nativo para un gen Zwf seleccionado o puede ser un promotor diferente del promotor nativo para un gen Zwf seleccionado (es decir, un promotor de un gen que no es Zwf). Cuando el microorganismo recombinante es una cepa de *A. succinogenes*, un promotor nativo o endógeno apropiado es el promotor de fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa de *A. succinogenes* (SEQ. NO. ID: 4), depositado con el número de acceso GenBank AY308832,

incluyendo nucleótidos 1-258 o una de sus variantes. El promotor pueden estar ligado operativamente al gen Zwf usando procedimientos de clonación que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el promotor y el gen Zwf se pueden amplificar por medio de PCR usando primers que incluyen sitios de reconocimiento de enzima con restricción compatibles. El promotor amplificado y el gen se puede someter posteriormente a digestión con la enzima y se pueden clonar para dar lugar a un vector apropiado que incluye un sitio de clonación múltiple apropiado.

Además, la molécula de ADN puede incluir un marcador que se puede escoger. El marcador que se puede escoger puede impartir resistencia frente a uno o más agentes antibióticos. Por ejemplo, los marcadores que se pueden escoger pueden incluir genes para resistencia frente a ampicilina, resistencia frente a estreptomicina, resistencia frente a canamicina, resistencia frente a tetraciclina, resistencia frente a cloranfenicol, resistencia frente a sulfonamida o combinaciones de estos marcadores. Normalmente, el marcador que se puede escoger puede estar ligado operativamente a un promotor que facilita la expresión del marcador. Los plásmidos y otros vectores de clonación que incluyen marcadores que se pueden escoger resultan conocidos en la técnica.

Se usa la molécula de ADN normalmente para transformar una célula de hospedador. Las células de hospedador apropiadas incluyen cualquier célula que sea útil para almacenar y/o producir la molécula de ADN.

Las células de hospedador apropiadas pueden incluir células que expresen cualquier gen presente en la molécula de ADN. Las células de hospedador apropiadas también pueden incluir células que sean capaces de producir un ácido orgánico en un proceso de fermentación, tal como un ácido succínico a una concentración para producción comercial (por ejemplo, al menos aproximadamente 20 g/l, de manera más apropiada al menos aproximadamente 50 g/l, y de manera más apropiada al menos aproximadamente 100 g/l).

Los procedimientos de producción de un ácido orgánico normalmente incluyen fermentación de un medio de nutriente con un microorganismo recombinante que expresa un gen Zwf. Por ejemplo, el procedimiento puede incluir fermentación de un medio de nutriente con un *A. succinogenes* recombinante que expresa un gen Zwf (por ejemplo, un gen Zwf heterólogo tal como un gen Zwf de *E. coli*). Los ácidos orgánicos producidos en la fermentación pueden incluir ácido succínico. Un microorganismo recombinante apropiado para los procedimientos es una cepa recombinante de *A. succinogenes* que expresa el gen Zwf de *E. coli*, depositado con el número de acceso ATCC PTA-6255. Los procedimientos también pueden incluir fermentación de un medio de nutriente con una cepa recombinante de Taxón de Bisgaard 6 o Taxón de Bisgaard 10 que expresa un gen Zwf (por ejemplo, un gen Zwf heterólogo tal como un gen Zwf de *E. coli*) para producir ácido succínico. Los procedimientos también pueden incluir la fermentación de un medio de nutriente con una cepa recombinante de *E. coli* que expresa un gen Zwf (o sobreexpresa un gen Zwf) para producir uno o más ácidos orgánicos tal como ácido láctico.

Los procedimientos pueden emplear microorganismos recombinantes que sean resistentes a niveles relativamente elevados del ácido orgánico que se produce (por ejemplo, ácido succínico). Los procedimientos pueden emplear cepas de microorganismos que sean resistentes a niveles relativamente elevados de sub-productos no deseados y/o cepas de microorganismos que produzcan niveles relativamente elevados de sub-productos no deseados.

Normalmente, el medio de nutriente incluye una fuente de carbono fermentable. Se puede proporcionar una fuente de carbono fermentable por medio de biomasa fermentable. La biomasa fermentable puede proceder de una variedad de cultivos y/o materias primas incluyendo: cultivos de azúcar (por ejemplo, azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce, caña de azúcar, remolacha azucarera para forraje); cultivos de almidón (por ejemplo, granos tales como maíz, trigo, sorgo, cebada y tubérculos tales como patatas y patata dulce); cultivos celulósicos (por ejemplo, forraje de maíz, fibra de maíz, paja de trigo, y forrajes tales como forraje de hierba de Sudán y sorgo). Se puede tratar la biomasa para facilitar la liberación de una fuente de carbono fermentable (por ejemplo, azúcares). Por ejemplo, la biomasa se puede tratar con enzimas tales como celulasa y/o xilanasa, para liberar azúcares simples. La fuente de carbono fermentable puede incluir azúcares simples y alcoholes de azúcar tales como glucosa, maltosa, manosa, manitol, sorbitol, galactosa, xilosa, arabinosa y sus mezclas.

Normalmente, los procedimientos tienen como resultado un rendimiento relativamente elevado de ácido succínico con respecto a una fuente de carbono de entrada tal como glucosa. Por ejemplo, los procedimientos pueden tener un rendimiento de ácido succínico (g) de al menos aproximadamente 90 % con respecto a la entrada de glucosa (g). Alternativamente, el rendimiento se puede calcular en forma de % de rendimiento de ácido succínico (mol) / entrada de glucosa (mol). Como tal, los procedimientos pueden tener un rendimiento de ácido succínico (mol) de al menos aproximadamente 140 % con respecto a la entrada de glucosa (mol). De manera deseable, los procedimientos pueden tener un rendimiento de ácido succínico (mol) de al menos aproximadamente 130 % o al menos aproximadamente 170 %, con respecto a la entrada de glucosa (mol).

Los procedimientos también dan como resultado, normalmente, una concentración elevada de producción de ácido succínico (por ejemplo, con respecto a un procedimiento que usa un microorganismo no-recombinante en una fermentación). Por ejemplo, la fermentación puede alcanzar una concentración de al menos aproximadamente 50 g/l de ácido succínico. De manera deseable, la fermentación puede alcanzar una concentración de al menos aproximadamente 90 g/l de ácido succínico o de manera más deseable, una concentración de al menos aproximadamente 130 g/l de ácido succínico. En algunas realizaciones, normalmente la fermentación no produce niveles sustanciales de sub-productos no deseados tales como acetato, formiato, piruvato y sus mezclas (por ejemplo,

no más de aproximadamente 2,0 g/l de acetato, no más de aproximadamente 2,0 g/l de formiato y/o no más de aproximadamente 3,0 g/l de piruvato).

Realizaciones ilustradas

- 5 En una realización, el microorganismo recombinante es una cepa recombinante de *Actinobacillus succinogenes* que expresa el gen Zwf heterólogo. El gen Zwf heterólogo se puede optimizar para la expresión en *Actinobacillus succinogenes*. El gen Zwf heterólogo puede codificar una enzima Zwf de *E. coli*. La cepa recombinante puede incluir un *Actinobacillus succinogenes* recombinante depositado con el Número de Acceso ATCC PTA-6255. La cepa recombinante puede ser capaz de producir ácido succínico en concentraciones de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 130 g/l (por ejemplo, en un sistema de fermentación que utilizan una fuente de carbono apropiada).
- 10 10 La cepa recombinante puede ser resistente a los niveles de monofluoro-acetato de sodio de al menos aproximadamente 1 g/l.
- En algunas realizaciones, la cepa recombinante es una cepa recombinante de un microorganismo que pertenece al Taxón de Bisgaard 6, Taxón de Bisgaard 10 que expresa un gen Zwf heterólogo. El gen Zwf heterólogo puede codificar la enzima Zwf de *E. coli*.
- 15 15 En otra realización, la cepa recombinante es una cepa recombinante de *Actinobacillus succinogenes*, que incluye una molécula de ADN que comprende un promotor de transcripción para *Actinobacillus succinogenes* ligado operativamente a un gen Zwf heterólogo. El promotor de transcripción puede incluir el promotor de *fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa* de *A. succinogenes* o una de sus variantes (por ejemplo, un polinucleótido de SEQ. NO. ID: 4 o un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ. NO. ID: 4, en el que el polinucleótido tiene actividad de promotor de *fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa* de *A. succinogenes*). El gen Zwf heterólogo puede codificar la enzima *Zwischenferment* de *E. coli* o una de sus variantes (por ejemplo, un polinucleótido de SEQ. NO. ID: 1 o un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ. NO. ID: 1, en el que el polinucleótido tiene actividad enzimática *Zwischenferment* de *E. coli*). El gen Zwf heterólogo puede incluir un gen Zwf de *E. coli*. Opcionalmente, el gen Zwf se puede optimizar para la expresión en *Actinobacillus succinogenes*. La molécula de ADN puede ser epigenética (por ejemplo, presente sobre un plásmido). La molécula de ADN puede incluir un marcador que se puede escoger (por ejemplo, resistencia frente a canamicina, resistencia frente a ampicilina, resistencia frente a estreptomicina, resistencia frente a sulfonamida, resistencia frente a tetraciclina, resistencia frente a cloranfenicol o una de sus combinaciones).
- 20 25 En otra realización, la cepa recombinante es una cepa recombinante de *Actinobacillus succinogenes* que comprende una enzima Zwf heteróloga. Se puede expresar la enzima Zwf heteróloga a partir de un gen Zwf que se ha optimizado para la expresión en *Actinobacillus succinogenes*. La enzima Zwf heteróloga puede incluir enzima de *Zwischenferment* de *E. coli*. La cepa recombinante puede incluir *A. succinogenes* recombinante depositada en el Número de Acceso ATCC PTA-6255. La cepa recombinante puede ser capaz de producir ácido succínico en concentraciones de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 130 g/l. Opcionalmente, la cepa recombinante es resistente frente a niveles de monofluoroacetato de sodio de al menos aproximadamente 1 g/l.
- 30 35 En una realización, el procedimiento de producción de ácido succínico incluye la fermentación de un medio de nutriente con un microorganismo recombinante que expresa un gen Zwf heterólogo. El microorganismo recombinante puede incluir una cepa recombinante de *Actinobacillus succinogenes* (por ejemplo, una cepa recombinante de *A. succinogenes* depositada con el Número de Acceso ATCC PTA-6255). El microorganismo recombinante puede incluir una cepa recombinante de Taxón de Bisgaard 6 o una cepa recombinante de Taxón de Bisgaard 10. El gen Zwf heterólogo puede incluir el gen Zwf de *E. coli*. Opcionalmente, la cepa recombinante es resistente frente a niveles de monofluoroacetato de sodio de al menos aproximadamente 1 g/l. Opcionalmente, la cepa recombinante es capaz de producir ácido succínico en concentraciones de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 130 g/l. El medio de nutriente puede incluir un azúcar fermentable (por ejemplo, glucosa). Normalmente, el procedimiento tiene como resultado un rendimiento de ácido succínico (g) de al menos aproximadamente 100 % con respecto a glucosa (g).
- 40 45 En una realización, la molécula de ADN recombinante incluye un promotor de transcripción para *A. succinogenes* ligado operativamente a un gen Zwf heterólogo. Por ejemplo, el promotor de transcripción puede incluir un promotor de *fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa* de *A. succinogenes* o una de sus variantes, (por ejemplo, un polinucleótido de SEQ. NO. ID: 4 o un polinucleótido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencias con respecto a SEQ. NO. ID: 4, en el que el polinucleótido tiene actividad de promotor de *fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa* de *Actinobacillus succinogenes*).
- 50 55 En una realización, la molécula de ADN recombinante está presente en un plásmido de ADN. Normalmente, el plásmido de ADN incluye un marcador que se puede escoger (por ejemplo, un gen seleccionado entre el grupo que consiste en resistencia frente a ampicilina, resistencia frente a canamicina, resistencia frente a estreptomicina, resistencia frente a tetraciclina, resistencia frente a cloranfenicol, resistencia frente a sulfonamida y sus combinaciones). La molécula de ADN, que puede estar presente en un plásmido de ADN, puede estar presente en una célula hospedadora. La célula hospedadora puede ser capaz de producir ácido succínico en concentraciones de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 130 g/l en un sistema de fermentación.

En una realización, el microorganismo recombinante es una cepa recombinante de un microorganismo productor de ácido succínico que se ha transformado con una molécula de ADN que expresa un polipéptido que tiene actividad enzimática Zwf. La molécula de ADN puede incluir un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad enzimática Zwf, que puede incluir actividad de NADP reductasa. La molécula de ADN puede incluir un polinucleótido

5 que codifica un polipéptido que tiene al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia (o de manera deseable al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia) con respecto a la secuencia de amino ácido de una enzima Zwf (por ejemplo, SEQ. NO. ID: 3 o SEQ. NO. ID: 6), en el que el polipéptido tiene una actividad enzimática Zwf (por ejemplo, actividad NADP reductasa). La molécula de ADN puede incluir una secuencia de polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia (o de manera deseable al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia) con respecto a la secuencia de polinucleótido de un gen Zwf (por ejemplo, SEQ. NO. ID: 1, SEQ. NO. ID: 2 o SEQ. NO. ID: 5), en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene actividad enzimática Zwf. En algunas realizaciones, la cepa recombinante puede proceder de un microorganismo cuyo ARNr 16S tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con respecto a ARNr 16S de *Actinobacillus succinogenes*. Por ejemplo, la cepa recombinante puede proceder de una cepa de *Actinobacillus succinogenes*, Taxón de Bisgaard 6 o Taxón de Bisgaard 10.

10 En otra realización, el microorganismo recombinante es una cepa recombinante de un microorganismo productor de ácido succínico que se ha transformado con un gen Zwf heterólogo. El gen Zwf heterólogo se puede optimizar para la expresión en el microorganismo. En algunas realizaciones, el gen Zwf heterólogo puede codificar una enzima Zwf de *E. coli*. En algunas realizaciones, el gen Zwf puede incluir un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ. NO. ID: 1, en el que el polinucleótido tiene una actividad enzimática Zwf.

15 En otra realización, el microorganismo recombinante es una cepa recombinante de un microorganismo productor de ácido succínico que se ha transformado con una molécula de ADN que incluye un promotor de transcripción para fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa ligada operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de enzima Zwf. El promotor de transcripción puede incluir un promotor de *fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa* de *Actinobacillus succinogenes*. En algunas realizaciones, el promotor puede incluir un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ. NO. ID: 4, en el que el polinucleótido tiene actividad de promotor.

20 En otra realización, el microorganismo recombinante es una cepa recombinante transformada con una molécula de ADN que es epigenética. La molécula de ADN puede estar presente en un plásmido.

25 En otra realización, el microorganismo recombinante es una cepa recombinante que es capaz de producir ácido succínico en concentraciones de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 130 g/l.

30 La cepa recombinante puede ser resistente a niveles de monofluoroacetato de sodio de al menos aproximadamente 1 g/l. En algunas realizaciones, la cepa recombinante es un *Actinobacillus succinogenes* recombinante depositado con el Número de Acceso ATCC PTA-6255.

35 En otra realización, el microorganismo recombinante se usa para producir ácido succínico en un procedimiento que incluye fermentar un medio de nutriente con el microorganismo recombinante. Normalmente, el medio de nutriente incluye azúcar fermentable tal como una glucosa. El procedimiento puede tener como resultado un rendimiento de ácido succínico (g) de al menos aproximadamente 100 % con respecto a glucosa (g).

40 En algunas realizaciones, la molécula de ADN que comprende un promotor de transcripción para un microorganismo productor de ácido succínico está operativamente ligada a un gen Zwf heterólogo. El promotor de transcripción puede incluir un promotor de *fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa*. En algunas realizaciones, el promotor incluye un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ. NO. ID: 4, en el que el polinucleótido tiene actividad de promotor. La molécula de ADN puede estar presente en un plásmido. La molécula de ADN puede estar presente en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula hospedadora capaz de producir ácido succínico en concentraciones de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 130 g/l).

Ejemplos

Cepas de Microorganismos y Plásmidos

50 La cepa de *A. succinogenes* FZ45 es una variante bacteriana estable de *Actinobacillus succinogenes* 130Z, que es resistente a monofluoroacetato de sodio. Véase Guettler et al., INT'L J. SYST. BACT. (1999) 49:207-216; y la patente de Estados Unidos 5.573.931. El vector de lanzadera pLS88 de *A. succinogenes* de *E. coli* (depositado en la American Type Culture Collection con número de acceso ATCC 86980) se obtuvo por parte de Dr. Leslie Slaney, Universidad de Manitoba, Canadá. Se describe el plásmido pLS88 como aislamiento a partir de *Haemophilus ducreyi* y puede conferir resistencia a sulfonamidas, estreptomicina y canamicina.

Manipulaciones genéticas

Generalmente, las manipulaciones de ADN recombinante siguieron los procedimientos descritos en la técnica. Se preparó plásmido de ADN por medio del procedimiento de lisis alcalina. Los volúmenes de resuspensión normales para la multicopia de plásmidos sometidos a extracción a partir de cultivos de 1,5 ml fueron de 50 μ l. La preparación de ADN más grande usó el estuche Quiagen Plasmid Purification Midi y Maxi de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Se adquirieron endonucleasas de restricción, Patrones de Peso Molecular y marcadores pre-teñidos a partir de New England Biolabs e Invitrogen y se llevaron a cabo las digestiones siguiendo las recomendaciones de los fabricantes, exceptuando que se usó aproximadamente un exceso de 5 veces de enzima. Se analizó ADN sobre geles de Tria-acetato-agarosa en presencia de bromuro de etidio. Se extrajo ADN a partir de geles de agarosa y se purificó usando el estuche de extracción de gel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se desfosforiló ADN 10 usando fosfatasa alcalina de camarón (Roche) en combinación con fracciones digeridas de restricción. Se inactivó térmicamente la fosfatasa a 70 °C durante 15 minutos. Se llevaron a cabo las ligaciones usando un exceso molar de 3 a 5 veces de inserto con respecto al ADN de vector en un volumen de reacción de 20 μ l y 1 μ l de Ligasa ADN T4 (New England Biolabs) durante 1 hora a 25°C. Se llevó a cabo la transformación de *E. coli* por medio del uso de "células competentes de eficacia de biblioteca", adquiridas en Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

15 Se colocaron el placas las transformaciones usando mezclas de ligación sin diluciones sobre placas LB estándar que contenían el antibiótico apropiado. Se llevaron a cabo las amplificaciones PCR usando el manual de Perkin Elmer como recomendación. Los diseños de primeros se basaron en las secuencias publicadas (proporcionadas por la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Los primeros incluyeron sitios de reconocimiento de enzima de restricción. Se analizaron los primeros en cuanto a la formación de dímero y horquilla y temperatura de fusión usando el programa Vector NTI. Se solicitaron todos los primeros a Michigan State Macromolecular Structure Facility. Se llevaron a cabo las amplificaciones en un Eppendorf Gradient Master Cycler, o en un Perkin Elmer

20 Thermocycler. Se determinaron las temperaturas de atemperado usando el programa Vector NTI para cada par de primeros. Se adquirieron las enzimas de restricción para la digestión de los productos amplificados en Invitrogen o New England Biolabs.

Plásmido pJR762.55

25 La secuencia de promotor fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa de *A. succinogenes* (Ppeck SEQ. NO. ID: 4 número de acceso GenBank AY308832, incluyendo nucleótidos 1-258) se amplificó a partir de ADN genómico de FZ45 de *A. succinogenes* usando los siguientes primeros: Avance, 5'-AAAGAATTCTTAATTCTTATCGGGAC (SEQ. NO. ID:7); e Inverso, 5'-GCGTCGACATACTCACCTCATTGAT (SEQ. NO. ID:8). Se incluyeron secuencias de restricción EcoRI y 30 Sall (nucleótidos subrayados) para facilitar la clonación, y se insertó el fragmento Ppeck de 0,27 kb resultante como fragmento EcoRIISall en pLS88 para producir el plásmido pJR762.55.

Plásmido pJR762.73

35 Se amplificó el gen Zwf de *E. coli* a partir de ADN genómico de cepa BL21 (DE3) (número de acceso ATCC NC_000913), usando los siguientes primeros: Avance, 5'-CCGCTCGAGGGCGGTAAACGCAAACAGC (SEQ. NO. ID:9); e Inverso, 5'-CCGCTCGAGTTACTCAAACCTCATTCCAGG EQ. NO. ID:10). Se incluyeron secuencias de restricción de Xhol (nucleótidos subrayados) para facilitar la clonación y se insertó el fragmento Zwf de 1,5 kb subsiguiente en el sitio Sa/l de pJR762.55 para producir el plásmido pJR762.73.

Transformación de *A. succinogenes*

40 Se prepararon células competentes de *A. succinogenes* para electroporación por medio del cultivo de células en medio de cultivo de soja tríptico (TSB) a un valor de OD₆₀₀ de ~0,6. Se centrifugaron las células, se lavaron dos veces con agua estéril, dos veces con glicerol de 10 % v/v y se resuspendieron en 0,01 x el volumen de cultivo original con 10 % de glicerol. Se congelaron de forma instantánea las células y se almacenaron a 80 °C. Se usaron aproximadamente 40 μ l de células descongeladas para la electroporación, en cubetas de 0,1 cm con BioRad GenePulser con configuraciones de 400 W, 25 mF y 1,8 kV. Tras la electroporación, se añadió de forma inmediata 1 ml de medio TSB 45 a temperatura ambiente y se incubaron las células a 37 °C durante 1 h. Se colocó en placas la disolución de células en placas de agar y TSB que contenían canamicina (100 μ g/ml).

Determinación de la densidad óptica de *A. succinogenes*

50 Se centrifugaron muestras de fermentaciones neutralizadas con magnesio a 420 x g durante 2 minutos para precipitar MgCO₃ y se diluyeron con HCl 0,5 N para disolver cualquier precipitado restante antes de la lectura a un valor de OD₆₆₀.

Fermentaciones por lotes de *A. succinogenes*

55 Se llevaron a cabo las fermentaciones de *A. succinogenes* en 51 dispositivos de fermentación que contenían el siguiente medio a menos que se especificara lo contrario 80 g/l de glucosa, 85 g/l de jarabe de alimentación líquido (LFS), 0,2 mg/l de biotina, fosfato 5 mM, 3g/l de extracto de levadura, Sensient AG900. Se mantuvo el pH en 7,0 con Mg(OH)₂. Se ajustó la agitación a 250 rpm, la temperatura en 38 °C y se roció dióxido de carbono a una tasa de 0,025 v.v.m. Se inocularon los dispositivos de fermentación con un inóculo de siembra de 1,25 %, y se introdujeron en viales

con suero que contenían el medio descrito con anterioridad. El medio de fermentación para las cepas recombinantes de *A. succinogenes* contenía 100 µg/ml de canamicina.

Purificación de LFS

Para las fermentaciones que requirieron una medida del crecimiento a través de mediciones de densidad óptica, se usó un extracto de LFS en agua fría. Se retiraron los sólidos en suspensión y algunos aceites a través de centrifugación de LFS en un rotor GSA Sorvall, a 9.000 rpm durante 20 minutos. Se permitió la sedimentación del sobrenadante en un embudo de decantación durante 3 horas a temperatura ambiente. Normalmente, la fase acuosa inferior representó un 57 % (peso/volumen) de LFS de materia prima.

Ensayos Bioquímicos para Verificar la Expresión Zwf

Se llevaron a cabo ensayos de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como se describe por parte de Choi y col., 2003. (Véase Choi, Jae-Chulk, Shin, Hyun-Dong, Lee, Yong-Hyun (2003) Enzyme and Microbial Technology 32, p.178-185; "Modulation of 3-hydroxyvalerate molar fraction on poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) using *Ralstonia eutropha* transformant co-amplifying phbC and NADPH generation-related Zwf genes"). Se midió la tasa de formación de D-6-fosfo-glucono-δ-lactona por medio del aumento de NADPH, que se cuantificó gracias a la medición de la absorbancia a 340 nm. Se llevó a cabo cada ensayo en 1 ml que contenía, 50 µl de Tris-HCl [1M], pH 7,5, 200 µl de MgCl₂ [50mM], 100 µl de NADP [10 mM], 100 µl de glucosa-6-fosfato [10 mM], 450 µl de H₂O y 100 µl de extracto celular. Se calculó la actividad específica como se muestra a continuación: Actividad Específica = dA/dt/0,623 × (concentración de proteína), o µmol/min mg⁻¹. Se observó una mayor actividad Zwf en todas las cepas recombinantes que incluían el plásmido pJR762.73, que expresa el gen de Zwf de *E. coli* a partir del promotor de PEPCK de *A. succinogenes*. Se observó una mayor actividad en la cepa de *Actinobacillus* transformada (FZ45) y en cepas transformadas de Taxón de Bisgaard 6 (BT6) y Taxón de Bisgaard 10 (BT10), que llevó a cabo el plásmido pJR762.73. Estos resultados se ilustran en la Figura 3.

Fermentaciones de *E. coli*

Se cultivaron cepas de *E. coli* DH5α/pJR762.73 (Zwf), DH5α/pJR762.17 (Zwf) y DH5α/pLS88 en dispositivos de fermentación NBS-5-litros Bioflo III usando cuatro litros del medio siguiente: 900AG extracto de levadura 15g; licor en reposo de maíz 15g; Na₂HPO₄ 1,16g; NaH₂PO₄.H₂O, 0,84g; (NH₄)₂SO₄ 3g; MgSO₄.7H₂O, 0,61; CaCl₂.2H₂O, 0,25g y glucosa, 45g por litro. Se controló el pH en 6,7 a través de la adición automática de K₂CO₃ (3,3N). Se comenzaron cada una de las fermentaciones con un inóculo de 1,25 %. Inicialmente las condiciones fueron aerobias y se favoreció una proliferación rápida de las células de *E. coli*; la agitación fue de 500 rpm y se roció el medio con aire a 0,5 litros/litro-minuto. Las condiciones del dispositivo de fermentación se hicieron aerobias para favorecer la producción de ácido orgánico cuando la densidad celular alcanzó un mínimo de 6,2 unidades de OD₆₆₀; posteriormente, se roció el medio con 0,2 litros/litro-minuto de una mezcla de CO₂ y H₂ mixture (95:5) y se redujo la agitación a 250 rpm. Se tomaron muestras de forma periódica y se determinaron las concentraciones de productos de ácido orgánico y glucosa residual por medio de HPLC.

Análisis Caldos de Fermentación

Se determinaron las concentraciones de ácido succínico, glucosa, ácido láctico, piruvato, etanol y ácido fórmico por medio de cromatografía de líquidos de alta presión con fase inversa (HPLC) usando una bomba Waters 1515 Isocratic con un dispositivo automático de toma de muestra Waters 717 y un detector de índice de refracción Waters 2414 ajustado a 35 °C. Se controló el sistema HPLC, se recogieron los datos y se procesaron usando un soporte lógico Waters Breeze (versión 3.3). Se usó una columna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) con una columna de guarda de H de catión mantenida a 55 °C. La fase móvil fue ácido sulfúrico de 0,021 N con un flujo de 0,5 ml/minuto. Se filtraron las muestras sobre un filtro de 0,45 µm y se inyectaron 5,0 µl en la columna. El tiempo de operación fue de treinta minutos.

Mediciones de CO₂

Se usó un controlador de flujo másico (Brooks modelo 58501) para controlar y suministrar CO₂ al sistema de rociado del dispositivo de fermentación a 100 ml/minuto. Se usó un medidor de flujo másico (Brooks modelo 5860I) para medir el CO₂ que salía del dispositivo de fermentación por medio del sistema condensador de gases de salida. Se conectaron dos medidores de flujo de CO₂ a un ordenador por medio de una interfaz Bio-Command de 4-20 ma. El soporte lógico de BioCommand Plus Bioprocessing controló la entrada y salida de flujo de CO₂ cada 60 segundos. Se expresó el consumo de CO₂ (ml/min) como la diferencia entre las tasas de entrada y salida durante un minuto concreto (CO₂uso = CO₂entrada – CO₂salida). El volumen de CO₂ consumido durante cualquier intervalo de fermentación concreto es la suma de las tasas de cada minuto del intervalo. Se calcularon los moles de CO₂ consumidos usando la Ley de los Gases Ideales, (litros consumidos ÷ 422,4 litros/mol = moles consumidos).

Se calibraron medidores de flujo másico por parte del fabricante para CO₂ y su precisión fue de 1 % de la escala completa o 2 ml/minuto. Se controló la configuración de fermentación para fugas de gas por medio de mezcla de 5 % de hidrógeno en el CO₂. Se detectaron fugas de hidrógeno usando un analizador Tif8800 CO/Combustible Gas.

Análisis de flujo metabólico de las fermentaciones de *A. succinogenes*

Se analizaron las distribuciones de flujo metabólico (MFA) durante la producción anaerobia de ácido succínico en *Actinobacillus succinogenes* usando un paquete de soporte lógico FluxAnalyzer. Se obtuvo el paquete FluxAnalyzer a partir del Profesor Steffen Klamt (Max Planck Institute, Magdeburgo, Alemania) y se operó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el manual. El paquete FluxAnalyzer facilita el análisis de flujos metabólicos proporcionando una interfaz de usuario gráfica para el programa MATLAB, que lleva a cabo los cálculos matemáticos reales. Se adquirió el soporte lógico MATLAB en MathWork Inc.. Por medio de la medición de los cambios en las concentraciones extracelulares de los componentes conocidos y esperados de toda la ruta metabólica, se calcularon los flujos intracelulares para los metabolitos intracelulares principales usando el modelo de red metabólica descrito a continuación. Se construyó la red metabólica (*A. succinogenes* marcado) usando 20 metabolitos conocidos y 27 reacciones mostradas a continuación (sin consideraciones de composición de biomasa y tasa de crecimiento):

Modelo de Red Metabólico de *A. succinogenes*

| | |
|---|-------|
| Glucosa (entrada) → Glucosa | (R1) |
| Glucosa → Glucosa-6P | (R2) |
| Glucosa-6P + 2 NAD → 2 PEP + 2 NADH | (R3) |
| PEP → Piruvato | (R4) |
| PEP + CO ₂ → OAA | (R5) |
| Piruvato → Piruvato (salida) | (R6) |
| Piruvato + NAD → Acetil-coA + NADH + CO ₂ | (R7) |
| Piruvato + NADH + CO ₂ → Ácido Málico | (R8) |
| Acetil-coA → Acetato | (R9) |
| Acetato → Acetato (salida) | (R10) |
| Acetato + OAA → Citrato | (R11) |
| Citrato + NAD → CO ₂ + NADH + α-KG | (R12) |
| OAA + NADH → Ácido Málico + NAD | (R13) |
| Ácido Málico → Fumarato | (R14) |
| Fumarato + NADH → Ácido succínico + NAD | (R15) |
| Ácido succínico → Ácido succínico (salida) | (R16) |
| CO ₂ (entrada) → CO ₂ | (R17) |
| Glicerol (entrada) → Glicerol | (R18) |
| Glicerol + 2 NAD → PEP + 2 NADH | (R19) |
| Sorbitol (entrada) → Sorbitol | (R20) |
| Sorbitol + NAD → Glucosa -6P + NADH | (R21) |
| Xilosa (entrada) → Xilosa | (R22) |
| Xilosa → R5P | (R23) |
| R5P + 5/3 NAD → 5/3 PEP + 5/3 NADH | (R24) |
| Glucosa-6P + 2 NADP → R5P + CO ₂ + 2 NADPH | (R25) |
| Acetil-coA + 2 NADH → Etanol + 2 NAD | (R26) |

Etanol → Etanol (salida)

(R27)

Se analizaron las muestras de fermentación durante el transcurso de las fermentaciones usando los procedimientos analíticos descritos con anterioridad. Se determinaron las concentraciones de glucosa, glicerol, arabinosa, xilosa, sorbitol, ácido succínico, ácido acético, etanol, piruvato, ácido láctico y los volúmenes de fermentación en cada

5 momento de toma de muestra. Se calculó la cantidad de metabolito de acuerdo con la fórmula: (metabolito, g) = V (dispositivo de fermentación, l) * C (metabolito, g/l). Se calculó la tasa de consumo de metabolito o la tasa de producción de metabolito durante el período de tiempo t_0-t_1 usando la fórmula: Tasa de consumo de metabolito (mol/h, t_0 y t_1) = [Cantidad(metabolito, g, t_0) – Cantidad(metabolito, g, t_1)] / [(t_1-t_0) * Peso Molecular del Metabolito]. A modo de comparación del flujo metabólico para todos los períodos de tiempo, se ajustaron la tasa de consumo o la tasa de 10 producción del metabolito en el mapa de flujo, asumiendo un consumo de glucosa en el mapa de flujo de 100. La tasa de consumo de metabolito o la tasa de producción en el mapa "Mcp" se determinaron de acuerdo con la siguiente fórmula: $Mcp = (\text{tasa de producción o consumo de metabolito}) \times 100 / (\text{tasa de consumo de glucosa})$.

Se introdujeron las tasas de consumo o producción de diversos metabolitos en el modelo de red metabólico en el paquete FluxAnalyzer de acuerdo con las instrucciones de operación: Se usó la función "Cálculo/Equilibrio de Tasas" 15 para calcular todas las tasas susceptibles de cálculo. Si el sistema era no redundante, se comenzó un procedimiento de optimización, en el que se minimizó una función objetivo lineal. Si el sistema fue redundante, se aplicaron uno o más procedimientos (mínimos cuadrados simple, mínimos cuadrados con ponderación de varianza I y mínimos cuadrados con ponderación de varianza II) para calcular las tasas. La tasa de flujo se muestra directamente sobre el mapa de flujo. Se copió el mapa de flujo final en archivos de Microsoft Excel con fines de almacenamiento.

20 Análisis de Flujo Metabólico de Rutas Bioquímicas en *A. succinogenes* FZ45

Se usó análisis de flujo metabólico para evaluar el efecto de las diferentes fuentes de carbono sobre la producción de ácido succínico en fermentaciones por lotes en *A. succinogenes* FZ45. Los análisis establecieron que la ruta principal para la producción de ácido succínico en *A. succinogenes* FZ45 transcurre de la siguiente forma: fosfoenolpiruvato (PEP) → oxaloacetato(OAA) → malato → fumarato → ácido succínico. Parece que la derivación de glioxilato y el 25 sistema de transporte de PEP (PTS) no se usan sustancialmente en el organismo. Las fermentaciones de glucosa alcanzan una concentración de 61,7 g/l de ácido succínico con un rendimiento de aproximadamente 94 % (ácido succínico (g) / glucosa (g)). Las fermentaciones llevadas a cabo usando una fuente de carbono más reducida, tal como sorbitol, produjeron cantidades más elevadas de ácido succínico (77,3 g/l) con un rendimiento más elevado (108 % de 30 ácido succínico (g) / glucosa (g)), lo que indica que el poder reductor puede convertirse en un factor limitante durante la fermentación de la glucosa.

Producción Mejorada de Ácido Succínico a partir de Glucosa por medio de Sobre-Expresión de Zwf

Se sometieron a cultivo cepas FZ45, FZ45/pLS88 y FZ45/pJR762.73 en condiciones de producción estándar con la excepción de que se añadieron 100 mg/ml de canamicina al medio de fermentación para las cepas transformadas. 35 FZ45/pLS88 sirvió como segundo control, y se transformó con el vector de clonación, transportando el promotor que no era de PEP carboxiquinasa o el gen Zwf. La fuente de carbono usada fue glucosa. La cepa FZ45/pJR762.73 mostró un aumento de la producción de ácido succínico con respecto a las cepas de control FZ45 y FZ45/pLS88, con un aumento correspondiente de la concentración final de ácido succínico. La cantidad total de ácido succínico producida a partir de glucosa aumentó de 284 g a 302 g, el rendimiento molar de ácido succínico producido aumentó de 144 % a 155 % (moles de ácido succínico /100 moles de glucosa), el rendimiento en peso aumentó de 94,7 % a 101,9 % y la 40 concentración final de ácido succínico en el caldo de fermentación aumentó de 62 g/l a 65 g/l. Estos resultados se recogen en la Tabla 1. Todos los derivados FZ45 transformados muestran un crecimiento menor en comparación con FZ45 no transformado, lo que puede venir causado por la replicación del ADN de plásmido extracromosómico adicional.

Tabla 1 Producción de Ácido Succínico a partir de Glucosa por medio de Cepas FZ45, FZ45/pLS88 y FZ45/pJR762.73

| Cepa | Rendimiento molar % | Rendimiento en peso (%) | g/L | Ácido Succínico Total [g] |
|----------------|---------------------|-------------------------|------|---------------------------|
| FZ45 | 144 | 94,7 | 61,7 | 284 |
| FZ45/pLS88 | 149 | 98,0 | 60,4 | 272 |
| FZ45/pJR762.73 | 155 | 101,9 | 65,4 | 302 |

Además, la cepa FZ45/pJR762.73 también produjo menos de los dos metabolitos de ácido acético y ácido pirúvico, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 Producción de Otros Metabolitos por medio de Cepas FZ45 y FZ45/pJR762.73

| Cepa | Ácido Succínico [g/l] | Ácido Pirúvico [g/l] | Ácido Acético [g/l] |
|----------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| FZ45 | 61,7 | 3,7 | 1,5 |
| FZ45/pLS88 | 60,4 | 2,1 | 1,4 |
| FZ45/pJR762.73 | 65,4 | 2,7 | 1,4 |

- 5 Los análisis de flujo metabólico tanto de FZ45 como de FZ45/pJR762.73 mostraron que FZ45/pJR762.73 provoca la derivación de más carbono a la ruta de pentosa fosfato que FZ45 no transformada (véase la Figura 1 y la Figura 2). De este modo, la sobre-expresión de la proteína Zwf resultó suficiente para mejorar los rendimientos de ácido succínico y para reducir la producción de otros metabolitos cuando se usó glucosa como fuente de carbono.

Fermentación con FZ45/pJR762.73 de *A. succinogenes* usando Fuente de Carbono Reducido

- 10 También se llevaron a cabo las fermentaciones con FZ45/pJR762.73 de *A. succinogenes* utilizando manitol como fuente de carbono. Manitol es un alcohol-azúcar de 6-carbonos que está más reducido que la glucosa. La expresión de Zwf también mejoró la producción de ácido succínico usando manitol (véase la Tabla 3). No obstante, las fermentaciones que usaron este alcohol de azúcar también mostraron rendimientos mejorados incluso con la cepa FZ45 no transformada. Esto indica que el aumento de la cantidad de equivalentes reductores metabólicos mejora la producción de ácido succínico.

Tabla 3 Producción de Ácido Succínico Usando Manitol como Fuente de Carbono

| Cepa | Fuente de Carbono | Rendimiento molar (%) | Rendimiento en peso (%) | g/l | Ácido Succínico [g totales] |
|----------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|------|-----------------------------|
| FZ45 | glucosa | 144 | 94,7 | 61,7 | 284 |
| FZ45 | manitol | 179 | 116,0 | 85 | 406 |
| FZ45/pJR762.73 | manitol | 193 | 125,4 | 88 | 421 |

- 15
- Efecto de la Expresión de Zwf en el Taxón de Bisgaard 10 y Taxón de Bisgaard 6 Recombinante
- También se sometió a ensayo el efecto de la expresión Zwf en otras especies usando el Taxón de Bisgaard 6 (BT6) y el Taxón de Bisgaard 10 (BT10) de organismos. Ambos organismos pertenecen a la familia Pateurellaceae, y están relacionados con *A. succinogenes*. De igual forma, se sabe que ambos organismos producen ácido succínico. Usando los procedimientos descritos anteriormente y el mismo plásmido, pJR762.73 (que transporta el gen Zwf bajo el promotor PEPCK de *A. succinogenes*), se transformaron los Taxones de Bisgaard . Ambas cepas transformadas mostraron un incremento de la producción de ácido succínico usando glucosa como fuente de carbono. Estos resultados se muestran en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4 Producción de Ácido Succínico a partir de Glucosa por medio de Cepas BT6/pJR762.73 y BT10/pJR762.73

| Cepa | Rendimiento molar (%) | Rendimiento en peso (%) | g/l | Ácido Succínico [g totales] |
|----------------|-----------------------|-------------------------|-----|-----------------------------|
| BT6/pLS88 | 92 | 60,3 | 40 | 174 |
| BT6/ pJR762.73 | 96 | 62,8 | 39 | 180 |
| BT10/pLS88 | 132 | 86,5 | 56 | 255 |
| BT10/pJR762.73 | 136 | 89,0 | 57 | 258 |

El análisis de flujo de estas fermentaciones con las cepas de Taxones de Bisgaard indicaron que el uso de la ruta de pentosa fosfato aumentó, de hecho, en la cepas que portaban el plásmido. BT6/pJR762.73 dirigió más carbono a través de la ruta de pentosa fosfato que el control(33 % en moles frente a 20 % en moles). De forma similar, BT10/pJR762.73 dirigió 35 % en moles de carbono a través de la ruta de pentosa fosfato, en comparación con únicamente un 5 % en moles del control.

5

Tabla 5 Listado de Secuencias

SEQ ID NO:1 - atggcgtt aacgaaaca gcccagggct gtgacacctggt
 cattttcgcc gcgaaaaggcg accttgcgcg tctgtaaattt ctgccttccc tgtatcaact
 ggaaaaagcc ggtcagctca acccggacac ccggattatc ggcgttagggc gtgctgactg
 ggataaaagcg gcatatacca aagttgtccg cgaggcgctc gaaactttca tgaaagaaac
 cattgtatgaa ggttatggg acaccctgag tgcacgtctg gatTTTgtatc atctcgatgt
 caatgacact gtcgttca gccgtctcg cgcgatgtcg gatcaaaaaaa atcgatcac
 catataactac ttgcctatgc cgcccagcac ttggcgca atttgcaaag ggcttggcga
 ggcaaaaactg aatgctaaac cggcacgctg agtcatggag aaaccgctgg ggacgtcgct
 ggcgacctcg cagggaaatca atgatcagggt tggcgaatac ttcgaggagt gccagggtta
 ccgtatcgac cactatcttgc gtaaagaaac ggtgctgaac ctgttggcgc tgcgtttgc
 taactccctg ttgtgaata actgggacaa tcgcaccatt gatcatgtt agattaccgt
 ggcagaagaa gtgggatcg aaggcgctg gggctatTTT gataaagccg gtcagatcg
 cgacatgatc cagaaccacc tgctgcaaattt tcttgcattg attgcgtatgt ctccggcgc
 tgacacctcg gcagacagca tccgcgatga aaaagtggaa gtaactgaatg ctctgegccc
 catcgaccgc tccaaacgtac gcaaaaaaac cgtacgcggg caatatactg cgggcttcgc
 ccagggcaaa aaagtgcgg gatatctgga agaagagggc gcaacaaga gcaatac
 agaaacttcc gtggcgatcc gctgcgatcat tgataactgg cgctggcccg gtgtgccatt
 ctacacctcg actggtaaac gtctgcccac caaatgttct gaagtcgtgg tctatttcaa
 aacacacctgaa ctgaatctgt ttaaagaatc gtggcaggat ctgcgcaga ataaactgac
 tatccgtctg caacctgatg aaggcgtgga tatccaggta ctgaataaag ttccctggcct
 tgaccacaaa cataacctgc aaatcaccaaa gctggatctg agctattcag aaacctttaa
 tcagacgcac ctggcgatg cctatgaacg tttgctgtcg gaaaccatgc gtggattca
 ggcactgttt gtacgtcgac acgaagtggaa agaagcctgg aaatgggttag actccattac
 tgaggcgtgg gcgatggaca atgatgcgcc gaaaccgtat caggccggaa cctggggacc
 cggtgcctcg gtggcgatga ttaccctgtga tggcgttcc tggaaatggatgatgatgaa
 SEQ ID NO:2 - atg gcggttaacgc
 aaacagcccc ggcctgtgac ctggcattt tcggcgaa aggccaccc ggcgtcgta
 aattgctgcc ttccctgtat caactggaaa aagccggta gtcaccccg gacacccggaa
 ttatcgccgt agggcgatgt gactggata aagccgcata taccaaaatgtt gtcccgagg
 cgctcgaaac tttcatgaaa gaaaccattt atgaagggtt atgggacacc ctgagtgcac
 gtctggattt ttgtatctc gatgtcaatg acactgtgc attcagccgt ctggcgccga
 tgctggatca aaaaaatcgatc accaccatata actacttgc catggccccc agcaacttttgc
 gcgcaatttgc caaagggtttt ggccaggccaa aactgaatgc taaaccggca cgcgtatgtca
 tggagaaacc gctggggacg tgcgtggcga cctcgccagga aatcaatgtatc caggttggcg
 aataacttcga ggagtgcac gtttaccgtt tcgaccacta tcttggtaaa gaaacgggtgc

(continuación)

tgaacctgtt ggcgctgcgt tttgctaact ccctgttgtt gaataactgg gacaatcgca
 ccattgatca tggtgagatt accgtggcag aagaagtggg gatcgaaggg cgctggggct
 attttgataa agccggtcag atgcgcgaca tgatccagaa ccacctgctg caaattcttt
 gcatgattgc gatgtctccg ccgtctgacc tgagcgcaga cagcatccgc gataaaaaag
 tgaaagtacc tgaagtctcg tcgcccgcate gaccgctcca acgtacgcga aaaaaccgta
 cgcgggcaat atactgcgtt ccccaggca aaaaagtgcc gggatatctg gaagaagagg
 gcgcaacaa gagcagcaat acagaaactt tcgtggcgat ccgcgtcgac attgataact
 ggcgctggc cggtgtgcca ttctacctgc gtactggtaa acgtctgccc accaaatgtt
 ctgaagtgcgt ggtctatttc aaaacacactg aactgaatct gtttaagaa tcgtggcagg
 atctgcgcga gaataaaactg actatccgtc tgcaacctga tgaaggcgtg gatatccagg
 tactgaataa agttcctggc cttgaccaca aacataacct gcaaattcacc aagctggatc
 tgagctattc agaaacacctt aatcagacgc atctggcgga tgcctatgaa cgtttgcgtc
 tggaaaccat gcgtggtatt caggcactgt ttgtacgtcg cgacgaagtg gaagaagcct
 ggaaatgggt agactccatt actgaggcgt gggcgatgga caatgatgcg ccgaaaccgt
 atcaggccgg aacctggga cccgttgctt cggtggcgat gattaccgt gatggtcgtt
 cctggaatga gttttagttaa
 SEQ ID NO:3 - MAVTQTAQACDLVIFGAKGDLARRKLLPSLYQLEKAGQLNPDTR
 IIGVGRADWDKAAYTKVVREALETFMKETIDEGLWDTLSARLDFCNLVDVNDTAAFSRL
 GAMLDQKNRITINYFAMPPSTFGAICKGLGEAKLNAKPARVVMEKPLGTSLATSQEIN
 DQVGHEYFEECQVYRIDHYLGKETVLNLLALRFANSLFVNNWDNRVIDHVEITVAEEVG
 IEGRWGYFDKAGQMRDMIQNHLLQILCMIAMSPPSDLSADSIRDEKVVKVLKSLRRIDR
 SNVREKTVRGQYTAGFAQGKKVPGYLEEEGANKSSNTETFVAIRVIDDNWRWAGVPFY
 LRTGKRLPTKCSEVVVFKTPELNLFKESWQDLPQNKLTIQLQPDEGVDIQVLNKVPG
 LDHKHNLQITKLDLSYSETFNQTHLADAYERLLLETMRGIQALFVRRDEVEEAWKWVD
 SITEAWAMDNDAPKPYQAGTWGPVASVAMITRDGRSWNEFE
 SEQ ID NO:4 - ttaatttctt taatcggtac gctatcgata aattaaaaat
 gcagcaatag aggaaacacg gtttggatgtt gtaaaaacag ccgtgtttt tcatttaccg
 ccataaaaat ttgaaacgga tcacaaatca tgaaaaaaat acgttcaaataat tagaactaat
 tatcgaaaat ttgatcttagt taacatttt taggtataaa tagttttaaa atagatctag
 tttggatttt taattttaaa ttatcaatga ggtgaagt

(continuación)

SEQ ID NO:5 - TTACGCTTT TTCTTCATGG AGCCCGAAGG TCTGCCCAT
 ACGCGTCCTT CACGGGCGAT AAGTTTATCC GCTTCCACCG GTCCCCAGGT GCCGGCTTCA
 TATTCTGAAA CGCGACCTTG GTTTCTTGT TAATCCAAA TCGGCTGCAC GAATTCCAG
 CAGGCGTGAA CGGCGTCGGT ACGGGCGAAT AATGTGGCGT CGCCTTCAT GGCGTCAAGC
 AGTAAACGTT CGTAGGCGGT TAATAAATTA GCGGAAGAAC TGATATCCGC ATAACGGAAA
 TCCATGGATA CTTCTTAGC CTCGAAGCCG GCTCCCGGT TTTCAAACC GAAGAACATG
 GAAATGCCCT CGTCCGGTTG GATACGGATG ATTAATTGT TATCCGGCGC ATTTGGCTG
 AATACCGGGT GCGGCGTGGT TTTGAAATGA ATGACGATTT CCGTCACCCG GGTCGGCAGG
 CGTTTACCCG TGCGCACGTA AAACGGCACG CCGGCCAGC GCCAGTTATC GATTGGCAG
 CGCAACGCCA TGTTAGGTTT GGTGCCGAA TCGGACGGCA CGCCCGCTTC CTCCAGATAA
 CCCCTCACCG GTTATCGTC AACGGTGGAG GCGGTGTATT GCCCTAAATAC CAGATTGTGT
 TTGAGATCTT CCGTGGTCAA CGGATGCAGA CAATAGAGCA CTTTGGCGGT TTCGTACGC
 ATGGAATCGG CGTTAATAAT CGCCGGCGGT TCCATGGCAA CCATTGCCAA TACTTGAAT
 AAGTGGTTT GGAAACATATC CCGCATTGCA CCGGAACCGT CATAATAGCC GCCCCGTTGT
 TCTACGCCGA TCTCTTCCGC GCGGTGATT TCTACGTAAT CGATGAAGTT ACGGTTCCAA
 AGCGGTTCGA ACAGGCCGTT GGAGAATCGC AGCACCAACA GATTTGCAC GGTTTCTTGT
 CCCAAATAAT GGTCGATACG GTAAATCTGG TGTTCCCTCGA AGAAACGGTG AATCTGAATA
 TCCAGTGCTT TGGCGGTTT AATATCGTAACCGGTT TTTCCACGAT AATCCGTTTC
 CAGCCGAATT CTTCCGTATT TAAGCCGTGA GCGGCCAGGC ATTCCGGAAT AACGCCGTAC
 AGGCTCGCG GAGTGGATAG ATAATAAAGC GTATTGCCGC AGGTTGGTA TTTGTCGTGT
 AATTATCCA AACGAGGCAG TAACTTACG TAATCCGCCG AATCGGAGGT GTTACCGCC
 TGGTAATACA GATGAGAACAA GAATTATCC AGCGTTTGC CTTCCGGCATT TTCTTGGGTA
 ATCAGGGCGG TTTCGATTTT TTCAACGGAAA ATGTCATCCG TCATTTCTGT GCGGGCCACT
 CCCAGCACGG AGAAGTTTC TTCAACCGT CCGATTTGT AAAGATTATA GAGTGCGGGA
 ATTAATTAC GGTGCGTCAG ATCCCCGTGAT GCGCCGAAAA TCACGATACA ATTATTCT
 GCTTCAT

SEQ ID NO:6 - MKAENN CIVIFGASGDLTHRKLIPALYNLYKIGRLEENFSVLGVARTEMT
 DDI FREDKMR TALITQENAEGETLDKFC SHLYQAVNTSDSADYV KLLPRLDELHD KYQTCGNTL
 YYLSTPPSLYGVPIPECLAHGLNTEFGWKRIIVEKPFYD IKTAKALDIQIHRFFEEHQIYRI
 DHYLGKETVQNLLVLRFSNGLFEPLWNRFIDYVEITGAEEIGVEQRGGYYDGSGAMRDMFQNH
 LLQVLAMVAMEPPAIINADSMRDETAKVLYCLHPLTEDLKHNLV LGQYTASTVDDKPVKGYLE
 EAGVPSDSGTETYMALRCQIDNWRWAGVPFYVRTGKRLPTRVTEIVIHFKTT PHPVFSQAPDN
 KLIIRIQPDEGISMFFGLKKPGAGFEAKEVSMDFRYADISSANLLTAYERLLL DAMKGDA TLF
 ARTDAVHACWKFVQPI LDYKENQGRVYEYEAGTWGPVEADKLIAREGRVWRRPSGS MKKA

SEQ ID NO:7 - AAAGAATTCTTAATTCTTAATCGGGAC

SEQ ID NO:8 - GCGTCGACATACTTCACCTCATTGAT

SEQ ID NO:9 - CCGCTCGAGGGCGGTAA CGCAAACAGC

SEQ ID NO:10 - CCGCTCGAGTTACTCAAACCTATTCCAGG

REIVINDICACIONES

1. Una cepa recombinante de un microorganismo productor de ácido succínico, habiendo sido transformado dicho microorganismo con al menos un polinucleótido que codifica una enzima Zwf y que está ligado operativamente a una secuencia de promotor, en la que la secuencia de ARNr 16S del microorganismo tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ARNr 16S de *Actinobacillus succinogenes*.
5
2. Una cepa recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho microorganismo está seleccionado entre *Actinobacillus succinogenes*, Taxón de Bisgaard 6 y Taxón de Bisgaard 10.
3. Una cepa recombinante de la reivindicación 1 o 2, en la que el polinucleótido comprende al menos un polinucleótido de *Escherichia coli* que codifica dicha enzima zwf.
10
4. Una cepa recombinante de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho polinucleótido comprende al menos un polinucleótido de *Actinobacillus succinogenes* que codifica dicha enzima zwf.
5. Una cepa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha secuencia de promotor comprende al menos un promotor de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa ligado operativamente a dicho polinucleótido que codifica dicha enzima zwf.
15
6. Una cepa recombinante de la reivindicación 1 o 5, en la que dicho promotor es un promotor de *Actinobacillus succinogenes*.
7. Una cepa recombinante de la reivindicación 1 o 5, en la que dicho promotor es un promotor de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de *Actinobacillus succinogenes*.
8. Una cepa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el polinucleótido que codifica la enzima zwf tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ. NO ID: 1.
20
9. Una cepa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la enzima zwf tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ. NO. ID:3.
10. Una cepa recombinante de *Actinobacillus succinogenes* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el polinucleótido comprende un promotor que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ. NO. ID: 4 y está ligado operativamente a un polinucleótido que tiene al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ. NO. ID: 1.
25
11. Una cepa recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho microorganismo es *Actinobacillus succinogenes* depositado con el Número de Acceso ATCC PTA-6255.
12. Un procedimiento para producir ácido succínico, que comprende someter a cultivo el microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en condiciones suficientes para producir ácido succínico.
30

Figura 1. Análisis de flujo metabólico de la fermentación por lotes de la variante FZ45 de *A. succinogenes* usando glucosa.

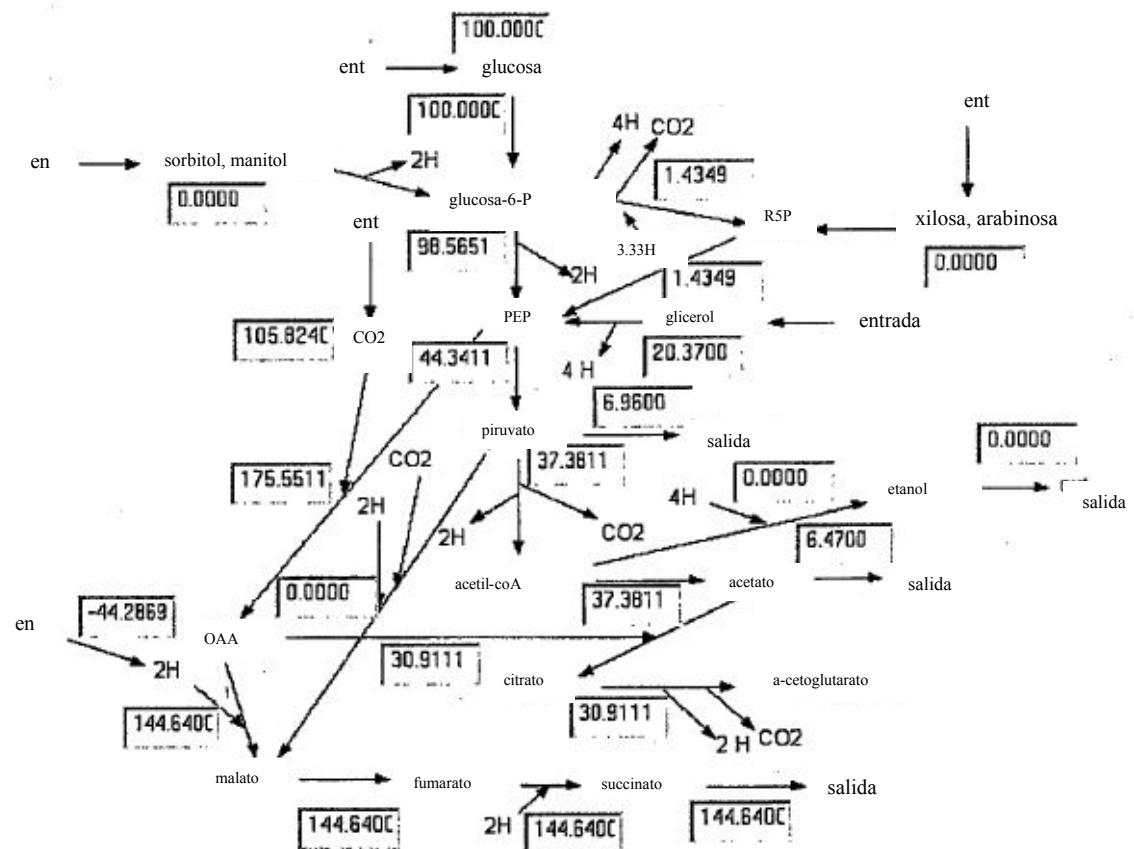
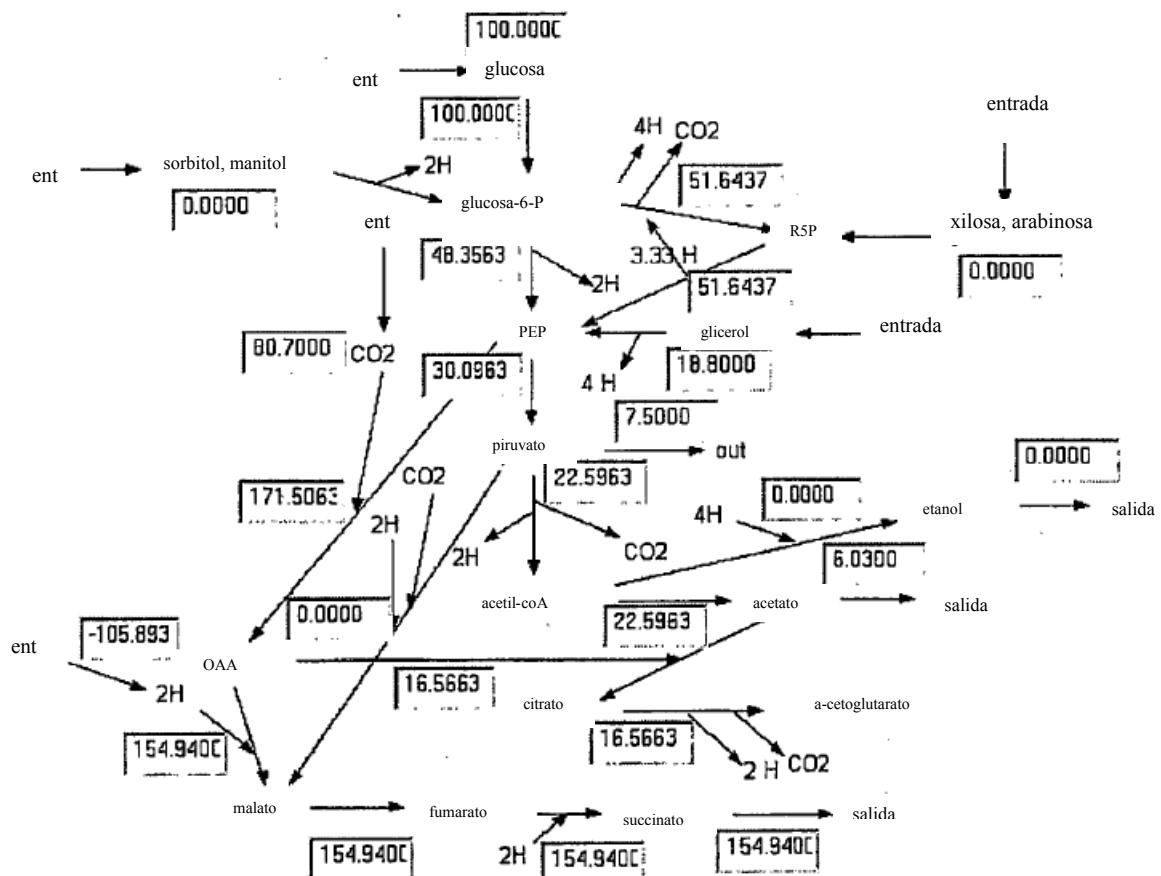


Figura 2. Análisis de flujo metabólico de la fermentación por lotes de FZ45/pJR762.73 de *A. succinogenes* FZ45/pJR762.73 usando glucosa.



ES 2 541 538 T3

Figura 3. Actividades enzimáticas Zwf en extractos celulares de cepas transformadas.

