

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 940 213**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2016** **PCT/EP2016/082415**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017** **WO17109091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2016** **E 16825761 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2022** **EP 3394251**

54 Título: **Células huésped para la producción de ácido dicarboxílico**

30 Prioridad:

23.12.2015 EP 15202593

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

04.05.2023

73 Titular/es:

TECHNIP ENERGIES FRANCE (100.0%)
2126 Boulevard de la Défense Immeuble
Origine-Cs 10266
92741 Nanterre Cedex, FR

72 Inventor/es:

LOS, ALRIK PIETER;
ZHAO, ZHENG;
VERWAAL, RENÉ;
PRONK, JACOBUS THOMAS y
POLDERMANS, ROLF

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 940 213 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

Células huésped para la producción de ácido dicarboxílico

5 **Campo de la invención**

10 [0001] La presente invención se refiere a una célula huésped capaz de producir un ácido dicarboxílico. La invención se refiere también a un procedimiento para mejorar la producción de ácido carboxílico en una célula huésped y a un procedimiento de producción de un ácido carboxílico utilizando una célula huésped de la invención. Adicionalmente la invención se refiere al uso de una modificación en el genoma de una célula huésped para aumentar la producción de ácido carboxílico en la célula huésped.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Los ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos, ácido málico, ácido fumárico y ácido succínico son precursores potenciales de numerosos elementos químicos. Por ejemplo, ácido succínico puede convertirse en 1,4-butanodiol (BDO), tetrahidrofurano y gamma-butirolactona. Otro producto derivado de ácido succínico es un polímero de poliéster que se fabrica uniendo ácido succínico y BDO.

20 [0003] Ácido succínico para el uso industrial se produce predominantemente petroquímicamente a partir de butano a través de hidrogenación catalítica de ácido maleico o anhídrido maleico. Estos procedimientos se consideran dañinos para el medio ambiente y costos. La producción fermentativa de ácido succínico se considera un procedimiento alternativo atractivo para la producción de ácido succínico, en donde se puede utilizar materia prima renovable como una fuente de carbono.

25 [0004] Se han llevado a cabo diferentes estudios sobre la producción fermentativa de ácido C4-dicarboxílico en levaduras (recombinante).

30 [0005] El documento EP2495304, por ejemplo, da a conocer una levadura recombinante adecuada para la producción de ácido succínico, modificado genéticamente con genes que codifican una piruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxinasa, una malato deshidrogenasa, una fumarasa, una fumarato reductasa y un transportador de succinato.

35 [0006] El documento WO 2013/003432 da a conocer levaduras que son capaces de producir succinato mediante la expresión de genes exógenos que codifican enzimas de vía TCA, tales como fumarasa y fumarato reductasa. Adicionalmente el documento da a conocer una eliminación de los genes *nde1*, *nde2* o *gut2* en la levadura para reducir la respiración o para potenciar la disponibilidad redox y, por consiguiente, aumentar la producción de succinato.

40 [0007] El documento WO 2012/103261 da a conocer células de levadura modificadas genéticamente que comprenden una secuencia activa de fermentación de succinato debido a la expresión de genes que codifican genes exportadores de piruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa, fumarasa, fumarato reductasa y succinato. Las levaduras comprenden además una eliminación o alteración de genes que codifican una enzima implicada en la producción de etanol o glicerol, entre otros una eliminación de deshidrogenasa de alcohol y una eliminación del gen de GPD que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa cistósólica.

50 [0008] Yan D et al., Bioresour Technol marzo de 2014;156:232-9 da a conocer una cepa *S. cerevisiae* que sobreexpresa enzimas heterólogas del ciclo reductivo TCA (por ejemplo, fumarasa y fumarato reductasa) y en la que el gen de GPD1 que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa se elimina para inducir la acumulación de reservas de carbono y potencial de reducción.

55 [0009] A pesar de los avances que se han realizado en la producción fermentativa de ácido dicarboxílico en células huésped, tales como levadura, no obstante, existe la necesidad de mejorar más las células huésped para la producción fermentativa de ácidos dicarboxílicos.

Características de la invención

60 [0010] La presente invención se basa en el descubrimiento de que la eliminación de uno o más genes que codifican enzimas provocan, directamente o indirectamente, la oxidación de uno o más cofactores, tales como NADH, puede aumentar la producción de ácido dicarboxílico en una célula huésped (cuya célula es capaz de producir el ácido dicarboxílico), tal como la producción de ácido succínico. Por consiguiente, la invención se refiere a una célula huésped de levadura, cuya célula huésped de levadura es una célula de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que es capaz de producir ácido succínico y que comprende

65 - una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia

tal como expuesta en SEQ ID NO: 40 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con SEQ ID NO: 40; y

- 5 - una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como expuesta en SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con SEQ ID NO: 41; y
- 10 - una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como expuesta en SEQ ID NO: 42 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con SEQ ID NO: 42; y
- 15 - como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como expuesta en SEQ ID NO: 57 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con SEQ ID NO: 57; y
- 20 - como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como expuesta en SEQ ID NO: 58 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con SEQ ID NO: 58; y

25 en donde la célula huésped sobreexpresa una o más copias de un ácido nucleico que codifica una fumarasa heteróloga y una o más copias de un ácido nucleico que codifica una fumarato reductasa.

[0011] La invención se refiere también a: un procedimiento de producción de un ácido dicarboxílico, cuyo procedimiento comprende la fermentación de una célula huésped de levadura de la invención en un medio de fermentación adecuado y la producción del ácido dicarboxílico.

Breve descripción de los dibujos

[0012]

- Figura 1 representa el mapa de plásmido de pSUC223.
- 35 Figura 2 representa una descripción esquemática del procedimiento de sustitución de PDC6 por un casete de expresión de FRD1.
- Figura 3 representa el mapa de plásmido de pSUC 228.
- Figura 4 representa una descripción esquemática del procedimiento de eliminación de GUT2.
- Figura 5 representa el mapa de plásmido de pSUC 227.
- 40 Figura 6 representa el mapa de plásmido de pSUC 225.
- Figura 7 representa una descripción esquemática del procedimiento de eliminación de NDE1.
- Figura 8 representa una descripción esquemática del procedimiento de eliminación de NDE2.
- Figura 9 representa una descripción esquemática del procedimiento de eliminación de GPD1.
- Figura 10 representa una descripción esquemática del procedimiento de eliminación de GPD2.

Descripción del listado de secuencias

[0013]

- 50 SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de aminoácidos de fumarasa fumB de *Escherichia coli*.
- SEQ ID NO: 2 representa la secuencia completa de ácidos nucleicos de plásmido pSUC223.
- SEQ ID NO: 3 representa la secuencia de aminoácidos de *FRD1* (codificada por *YEL047c*) que carece de los primeros 19 aminoácidos.
- SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de ácidos nucleicos del gen sintético TDH3p-FRD1-TDH3t.
- 55 SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 1 (TDH3p FW con saliente PDC6 5').
- SEQ ID NO: 6 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 2 (TDH3t REV con saliente hacia pSUC228 Cre-1).
- SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 3 (pSUC228 Cre-1 FW con saliente TDH3t).
- 60 SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 4 (DBC-03373, pSUC228 Cre-1 REV).
- SEQ ID NO: 9 representa la secuencia completa de ácidos nucleicos de plásmido pSUC228.
- SEQ ID NO: 10 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 5 (DBC-03374, pSUC225 Cre-2 FW).
- SEQ ID NO: 11 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 6 (pSUC225 Cre-2 REV con saliente PDC6 3').
- 65 SEQ ID NO: 12 representa la secuencia de aminoácidos de fumarato reductasa de *Trypanosoma brucei* glicosomal (FRDg) que carece de una señal de direccionamiento del extremo C-terminal de 3 aminoácido.

- SEQ ID NO: 13 representa la secuencia de aminoácidos de fumarasa de *Rhizopus oryzae*, que carece de los primeros 23 aminoácidos del extremo N-terminal.
- SEQ ID NO: 14 representa la secuencia de aminoácidos de fosfoenolpiruvato carboxicina de *Actinobacillus succinogenes*, con modificación desde EGY hasta DAF en posición 120 - 122.
- 5 SEQ ID NO: 15 representa la secuencia de aminoácidos de malato deshidrogenasa peroxisomal (Mdh3) de *Saccharomyces cerevisiae*, que carece de la secuencia de direccionamiento de peroxisoma del extremo C-terminal (aminoácidos SKL).
- SEQ ID NO: 16 representa la secuencia de aminoácidos de piruvato carboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- SEQ ID NO: 17 representa la secuencia de aminoácidos de isocitrato liasa de *Kluyveromyces lactis*.
- 10 SEQ ID NO: 18 representa la secuencia de aminoácidos de malato sintasa peroxisomal (Mls1) de *Saccharomyces cerevisiae*, que carece de la secuencia de direccionamiento de peroxisoma del extremo 3 C-terminal.
- SEQ ID NO: 19 representa la secuencia de aminoácidos de un transportador de ácido dicarboxílico desde *Aspergillus niger*.
- 15 SEQ ID NO: 20 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 7 (FW en la dirección 5' de GUT2).
- SEQ ID NO: 21 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 8 (REV en la dirección 5' de GUT2 50bp Lox66).
- SEQ ID NO: 22 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 9 (Cre_1 REV).
- SEQ ID NO: 23 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 10 (Cre_2 FW).
- 20 SEQ ID NO: 24 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 11 (FW GUT2-KO-Cre_1).
- SEQ ID NO: 25 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 12 (REV GUT2-KO-Cre_2).
- SEQ ID NO: 26 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 13 (FW en la dirección 3' de GUT2 50bp Lox71).
- SEQ ID NO: 27 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 14 (REV en la dirección 3' de GUT2).
- 25 SEQ ID NO: 28 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 15 (FW en la dirección 5' de NDE2).
- SEQ ID NO: 29 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 16 (REV en la dirección 5' de NDE2 50bp Lox66).
- SEQ ID NO: 30 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 17 (FW en la dirección 3' de NDE2 50bp Lox71).
- 30 SEQ ID NO: 31 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 18 (REV en la dirección 3' de NDE2).
- SEQ ID NO: 32 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 19 (FW NDE2-KO-Cre_1).
- SEQ ID NO: 33 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 20 (REV NDE2-KO-Cre_2).
- SEQ ID NO: 34 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 21 (FW en la dirección 5' de NDE1).
- SEQ ID NO: 35 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 22 (REV en la dirección 5' de NDE1 50bp Lox66).
- 35 SEQ ID NO: 36 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 23 (FW en la dirección 3' de NDE1 50bp Lox71).
- SEQ ID NO: 37 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 24 (REV en la dirección 3' de NDE1).
- SEQ ID NO: 38 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 25 (FW NDE1-KO-Cre_1).
- 40 SEQ ID NO: 39 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 26 (REV NDE1-KO-Cre_2).
- SEQ ID NO: 40 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de NDE1.
- SEQ ID NO: 41 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de NDE2.
- SEQ ID NO: 42 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de GUT2.
- SEQ ID NO: 43 representa la secuencia ácidos nucleicos de pSUC227.
- 45 SEQ ID NO: 44 representa la secuencia ácidos nucleicos de pSUC225.
- SEQ ID NO: 45 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 27 (FW en la dirección 5' de gpd1).
- SEQ ID NO: 46 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 28 (REV en la dirección 5' de gpd1).
- SEQ ID NO: 47 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 29 (FW GPD1-KO-Cre_1).
- SEQ ID NO: 48 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 30 (REV GPD1-KO-Cre_2).
- 50 SEQ ID NO: 49 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 31 (FW en la dirección 3' de gpd1).
- SEQ ID NO: 50 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 32 (REV en la dirección 3' de gpd1).
- SEQ ID NO: 51 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 33 (FW en la dirección 5' de gpd2).
- SEQ ID NO: 52 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 34 (REV en la dirección 5' de gpd2).
- SEQ ID NO: 53 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 35 (FW gpd2-KO-Cre_1).
- 55 SEQ ID NO: 54 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 36 (REV gpd KO Cre-2).
- SEQ ID NO: 55 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 37 (FW en la dirección 3' de gpd2).
- SEQ ID NO: 56 representa la secuencia de ácidos nucleicos del cebador 38 (REV en la dirección 3' de gpd2).
- SEQ ID NO: 57 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de GPD1 (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 1).
- 60 SEQ ID NO: 58 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de GPD2 (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 2).
- SEQ ID NO: 59 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1).
- SEQ ID NO: 60 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ADH2 (alcohol deshidrogenasa 2).
- 65 SEQ ID NO: 61 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ADH3 (alcohol

deshidrogenasa 3).

SEQ ID NO: 62 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ADH4 (alcohol deshidrogenasa 4).

5 SEQ ID NO: 63 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ADH5 (alcohol deshidrogenasa 5).

SEQ ID NO: 64 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ADH6 (alcohol deshidrogenasa 6).

SEQ ID NO: 65 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ALD2 (aldehído deshidrogenasa 2).

10 SEQ ID NO: 66 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ALD3 (aldehído deshidrogenasa 3).

SEQ ID NO: 67 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ALD4 (aldehído deshidrogenasa 4).

15 SEQ ID NO: 68 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ALD5 (aldehído deshidrogenasa 5).

SEQ ID NO: 69 representa la secuencia de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* de ALD6 (aldehído deshidrogenasa 6).

SEQ ID NO: 70 representa la secuencia de aminoácidos de fumarasa de *Arabidopsis thaliana*.

20 **Descripción detallada de la invención**

[0014] A lo largo de la especificación presente y las reivindicaciones que la acompañan, las palabras «comprender», «incluir» y «tener» y las variaciones tales como «comprende», «incluye» y «que incluye» deben interpretarse de manera inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden transmitir la inclusión posible de otros
25 elementos o números enteros que no se mencionan de manera específica, donde el contexto lo permite.

[0015] Los artículos «un» y «una» tal como se utilizan en el presente documento se refieren a uno o más de uno (es decir, a como mínimo uno) objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» puede significar «un elemento o más de un elemento» o «como mínimo un elemento».

30 [0016] La presente invención se basa en el descubrimiento de que la eliminación de uno o más genes que codifican enzimas involucradas, directamente o indirectamente, en la oxidación de uno o más cofactores, tales como NADH, puede aumentar la producción de ácido dicarboxílico en una célula huésped (cuya célula es capaz de producir el ácido dicarboxílico), tal como la producción de ácido succínico.

35 [0017] Por consiguiente, se da a conocer una célula huésped capaz de producir un ácido dicarboxílico y que comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una etapa enzimática que cataliza la oxidación de un cofactor.

40 [0018] La deficiencia de una etapa enzimática que cataliza la oxidación de un cofactor a la que se hace referencia en el presente documento se define como una característica fenotípica, en donde la célula huésped de la invención, debido a la modificación en el genoma, genera durante dicha etapa enzimática menos cofactor en un estado parcialmente o completamente oxidado en comparación a la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención y cuando se analiza bajo las condiciones
45 sustancialmente idénticas.

[0019] Es decir, la deficiencia de una etapa enzimática que cataliza la oxidación de un cofactor en la célula huésped de la invención provoca la oxidación reducida de una forma parcialmente o completamente reducida del cofactor durante dicha etapa en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención (cuando se analiza bajo las mismas condiciones sustancialmente
50 idénticas).

[0020] Por consiguiente, la disponibilidad de uno o más cofactores en un estado más reducido (parcialmente o completamente reducido) en la célula huésped de la invención aumenta en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención (cuando se analiza bajo las mismas condiciones sustancialmente idénticas).

[0021] La deficiencia de una etapa enzimática que cataliza la oxidación de un cofactor en una célula huésped de la invención es típicamente el resultado de una modificación en el genoma en el cual la célula: a) produce menos polipéptido y/o b) tiene un nivel reducido de expresión del ARNm transcrito a partir de un gen que
60 codifica el polipéptido y/o c) produce un polipéptido que tiene una actividad disminuida de proteína o una actividad disminuida específica de proteína y/o d) produce menos producto generado por el polipéptido y las combinaciones de una o más de estas posibilidades en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención, cuando se analiza bajo las mismas condiciones
65 sustancialmente idénticas. El polipéptido puede ser el que provoca directamente o indirectamente la oxidación de uno o más cofactores.

[0022] En este contexto, un gen se define por medio de la presente como un polinucleótido que contiene un marco de lectura abierto (ORF) conjuntamente con sus elementos de control de transcripción (promotor y terminador), el ORF siendo la región del gen que se transcribirá y se traducirá en la secuencia de proteínas.

[0023] Por lo tanto, la deficiencia de una etapa enzimática se puede medir mediante la determinación de la cantidad y/o actividad (específica) de un polinucleótido que provoca directamente o indirectamente la oxidación de uno o más cofactores generados por la célula huésped de la invención tal como se define anteriormente y/o se puede medir mediante la determinación de la cantidad de ARNm transcrito a partir de un gen que codifica el polinucleótido y/o se puede medir mediante la determinación de la cantidad de un producto generado por el polipéptido en la célula huésped de la invención tal como se define anteriormente y/o se puede medir mediante la secuenciación del gen o genoma, cuando se compara con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención (cuando se analiza bajo las condiciones sustancialmente idénticas). La deficiencia en la producción de un polipéptido se puede medir utilizando cualquier ensayo disponible para el experto en la técnica, tal como determinación del perfil transcripcional, RT-PCR de la mancha northern, Q-PCR, proteómica y mancha western.

[0024] La modificación de un genoma de una célula huésped se define en el presente documento como cualquier hecho que provoca un cambio en una secuencia de polinucleótidos en el genoma de la célula. Una modificación se interpreta como una o más modificaciones. Se puede iniciar una modificación mediante mejoría clásica de cepas, mutagénesis aleatoria seguida de selección. Se puede lograr una modificación mediante la introducción (inserción), sustitución o extracción (eliminación) de uno o más nucleótidos en una secuencia de nucleótidos. Esta modificación puede ocurrir, por ejemplo, en una secuencia o un elemento regulador necesario para la transcripción o la traducción del polinucleótido. Por ejemplo, se puede insertar o eliminar los polinucleótidos con el fin de provocar la introducción de un codón de terminación, la eliminación de un codón de inicio o un cambio o un cambio de marco del marco de lectura abierto de una secuencia codificadora. Se puede lograr la modificación de una secuencia codificadora o un elemento regulador de la misma mediante la mutagénesis de sitio dirigido o aleatoria, procedimientos de transposición de ADN, procedimientos de reconstrucción de ADN, síntesis genética (véanse, por ejemplo, Young y Dong, (2004), *Nucleic Acids Research* 32, (7) acceso electrónico <http://nar.oupjournals.org/cgi/reprint/32/7/e59> o Gupta et al. (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 60: 1338-1344; Scarpulla et al. (1982), *Anal. Biochem.* 121: 356-365; Stemmer et al. (1995), *Gene* 164: 49-53), o mutagénesis generada por PCR de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Los ejemplos de procedimientos de mutagénesis aleatoria se conocen bien en la técnica, tales como, por ejemplo, mutagénesis química (NTG, por ejemplo) o mutagénesis física (UV, por ejemplo). Los ejemplos de los procedimientos de mutagénesis dirigida son el kit de mutagénesis de sitio dirigido QuickChange™ (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA), el «The Altered Sites® II in vitro Mutagenesis Systems» (Promega Corporation) o mediante la extensión de superposición utilizando PCR tal como se describe en *Gene* (1989) 77(1):51-9 (Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction") o utilizando PCR tal como se describe en *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends*. (Eds. A.M. Griffin y H.G. Griffin. ISBN 1-898486-01-8; 1995 Horizon Scientific Press, PO Box 1, Wymondham, Norfolk, R. U.).

[0025] Se puede determinar una modificación en el genoma comparando la secuencia de DNA de la célula huésped modificada con la secuencia de la célula huésped madre. Se puede realizar la secuenciación de ADN y la secuenciación genómica utilizando los procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, utilizando tecnología de secuenciación Sanger y/o tecnologías de secuenciación de última generación, tales como Illumina GA2, Roche 454, etc. tal como se analizó en Elaine R. Mardis (2008), *Next-Generation DNA Sequencing Methods, Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9: 387-402. (doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359).

[0026] Los procedimientos preferidos de modificación se basan en técnicas de sustitución genética, eliminación genética o alteración genética.

[0027] Por ejemplo, en el caso de sustitución de un polinucleótido, una construcción de ácido nucleico o un casete de expresión, se puede introducir una secuencia de ADN adecuada en el locus diana para la sustitución. La secuencia de ADN adecuada preferiblemente está presente en un vector de clonación. Los vectores de clonación integrales preferidos comprenden un fragmento de ADN, que es homólogo al polinucleótido y/o tiene la homología con el polinucleótido que flanquea al locus a ser sustituido para el dirigir la integración del vector de clonación en este locus predeterminado. Para promover la integración dirigida, el vector de clonación se linealiza preferiblemente antes de la transformación de la célula. Preferiblemente, la linealización se lleva a cabo de tal modo que como mínimo una pero preferiblemente cualquiera de las dos terminaciones del vector de clonación esté flanqueada por las secuencias homólogas a la secuencia de ADN (o secuencias flanqueantes) a ser sustituidas. Este procedimiento se denomina recombinación homóloga y también se puede utilizar esta técnica para alcanzar la eliminación genética o alteración genética (parcial).

[0028] Por ejemplo, para la eliminación genética, se puede reemplazar un polinucleótido que corresponde al

polinucleótido endógeno por un polinucleótido defectuoso, que es un polinucleótido que no consigue generar una proteína (completamente funcional). Mediante la recombinación homóloga, el polinucleótido defectuoso reemplaza el polinucleótido endógeno. Podría ser conveniente que el polinucleótido defectuoso también codifique un marcador, que se puede utilizar para la selección de transformantes en los que la secuencia de ácidos nucleicos ha sido modificada.

[0029] Alternativamente, se puede llevar a cabo la modificación, en donde dicha célula huésped genera menos o es deficiente en la producción de uno de los polinucleótidos descritos en el presente documento, mediante las técnicas antisentido establecidas que utilizan una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido. Más específicamente, se puede reducir o eliminar la expresión del polinucleótido por una célula huésped de la invención mediante la introducción de una secuencia de polinucleótidos complementaria a la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido, que se puede transcribir en la célula y es capaz de hibridar con el ARNm producido en la célula. Bajo las condiciones que permiten la hibridación de la secuencia de nucleótidos antisentido complementaria con el ARNm, se reduce o se elimina de este modo la cantidad de proteína traducida. Un ejemplo de expresión de ARN antisentido se muestra en Appl. Environ. Microbiol. (2000) febrero; 66(2):775-82 (*Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase A, in the protein secretory pathway of Aspergillus niger*. Ngiam C, Jeenes DJ, Punt PJ, Van Den Hondel CA, Archer DB) o (Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U. Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. Planta. (1993); 190(2):247-52).

[0030] Es más, la modificación, regulación negativa o desactivación de un polinucleótido se puede conseguir a través de las técnicas de ARN de interferencia (ARNi) (FEMS Microb. Lett. 237 (2004): 317-324). En este procedimiento, las partes idénticas sentido y antisentido de la secuencia de nucleótidos, cuya expresión se ve afectada, se clonan una detrás de la otra con un espaciador de nucleótidos en el medio, y se introducen en un vector de expresión. Después de la transcripción de tal molécula, la formación de pequeños fragmentos de nucleótidos provocará una degradación dirigida del ARNm, que se ve afectado. La eliminación del ARNm específico puede ser de diferentes grados. Las técnicas de ARN de interferencia descitas en WO2008/053019, WO2005/05672A1, WO2005/026356A1, Oliveira et al., «Efficient cloning system for construction of gene silencing vectors in *Aspergillus niger*» (2008) Appl. Microbiol. y Biotechnol. 80 (5): 917-924 y/o Barnes et al., «siRNA as a molecular tool for use in *Aspergillus niger*» (2008) Biotechnology Letters 30 (5): 885-890 pueden utilizarse para la regulación negativa, modificación o desactivación de un polinucleótido.

[0031] En el presente documento, un cofactor se refiere típicamente a un compuesto químico no proteína que es necesario para la actividad biológica de una proteína, tal como una enzima. Es decir, el cofactor puede considerarse una «molécula ayudante» que estimula una transformación bioquímica. En el contexto de la invención, los términos «cofactor» y «coenzima» tienen el mismo significado y se utilizan de manera intercambiable.

[0032] Típicamente, la modificación en el genoma de la célula huésped de la invención provocará una deficiencia en la oxidación de un cofactor orgánico. Tales cofactores típicamente son moléculas orgánicas pequeñas (típicamente una masa molecular inferior a 1000 Da) que pueden estar débilmente o fuertemente unidas a la enzima y pueden participar directamente en la reacción. Un cofactor puede estar fuertemente unido a algunas enzimas, mientras esté débilmente unido a otras.

[0033] En una célula huésped de la invención, la modificación en el genoma genera una deficiencia de oxidación de una forma parcialmente o completamente reducida del cofactor. En la invención, el cofactor puede ser NADH, NADPH o FADH₂.

[0034] La modificación en el genoma de una célula huésped de la invención puede provocar directamente o indirectamente una deficiencia de la oxidación de un cofactor.

[0035] En una célula huésped de la invención, la modificación en el genoma provoca típicamente la deficiencia de como mínimo una etapa enzimática que cataliza la oxidación de un cofactor en el citosol.

[0036] En una célula huésped de levadura de la invención, la célula huésped de levadura comprende

- una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como expuesta en SEQ ID NO: 40 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 40; y

- una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como expuesta en SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 41; y

- una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como expuesta en SEQ ID NO: 42 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 42; y

- como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como expuesta en SEQ ID NO: 57 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 57; y

- como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como expuesta en SEQ ID NO: 58 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 58; y

en donde la célula huésped sobreexpresa una o más copias de un ácido nucleico que codifica una fumarasa heteróloga y una o más copias de un ácido nucleico que codifica una fumarato reductasa, o una combinación de las mismas con como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una deshidrogenasa de alcohol y/o con como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una deshidrogenasa de aldehído.

[0037] En una célula huésped de levadura de la invención, la NADH deshidrogenasa externa mitocondrial tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 40 respectivamente la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, por ejemplo, como mínimo 91 % de identidad, por ejemplo como mínimo 92 % de identidad, por ejemplo como mínimo 93 % de identidad, por ejemplo como mínimo 94 % de identidad, por ejemplo como mínimo 95 % de identidad, por ejemplo como mínimo 96 % de identidad, por ejemplo como mínimo 97 % de identidad, por ejemplo como mínimo 98 % de identidad, por ejemplo como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 40 respectivamente la SEQ ID NO: 41.

[0038] En una célula huésped de la invención, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 42 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, por ejemplo como mínimo 91 % de identidad, por ejemplo, como mínimo 92 % de identidad, por ejemplo como mínimo 93 % de identidad, por ejemplo como mínimo 94 % de identidad, por ejemplo como mínimo 95 % de identidad, por ejemplo como mínimo 96 % de identidad, por ejemplo como mínimo 97 % de identidad, por ejemplo como mínimo 98 % de identidad, por ejemplo como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 42.

[0039] En una célula huésped de la invención, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 57 respectivamente la SEQ ID NO: 58 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, por ejemplo como mínimo 91 % de identidad, por ejemplo como mínimo 92 % de identidad, por ejemplo como mínimo 93 % de identidad, por ejemplo como mínimo 94 % de identidad, por ejemplo como mínimo 95 % de identidad, por ejemplo como mínimo 96 % de identidad, por ejemplo como mínimo 97 % de identidad, por ejemplo como mínimo 98 % de identidad, por ejemplo como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 57 respectivamente la SEQ ID NO: 58.

[0040] En una célula huésped de la invención, la deshidrogenasa de alcohol tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 35 % de identidad, más preferiblemente como mínimo 40 % de identidad, más preferiblemente como mínimo 45 % de identidad, más preferiblemente como mínimo 50 % de identidad, más preferiblemente como mínimo 55 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 60 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 65 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 70 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 75 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 80 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 85 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 90 % de identidad, por ejemplo como mínimo 91 % de identidad, por ejemplo como mínimo 92 % de identidad, por ejemplo como mínimo 93 % de identidad, por ejemplo como mínimo 94 % de identidad, por ejemplo como mínimo 95 % de identidad, por ejemplo como mínimo 96 % de identidad, por ejemplo como mínimo 97 % de identidad, por ejemplo como mínimo 98 % de identidad, por ejemplo como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64.

[0041] En una célula huésped de la invención, la deshidrogenasa de aldehído tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 35 %

de identidad, más preferiblemente como mínimo 40 % de identidad, más preferiblemente como mínimo 45 % de identidad, más preferiblemente como mínimo 50 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 55 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 60 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 65 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 70 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo

75 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 80 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 85 % de identidad, incluso más preferiblemente como mínimo 90 % de identidad, por ejemplo como mínimo 91 % de identidad, por ejemplo como mínimo 92 % de identidad, por ejemplo como mínimo 93 % de identidad, por ejemplo como mínimo 94 % de identidad, por ejemplo como mínimo 95 % de identidad, por ejemplo como mínimo 96 % de identidad, por ejemplo como mínimo 97 % de identidad, por ejemplo como mínimo 98 % de identidad, por ejemplo como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69.

[0042] En una realización, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial tal como se especifica anteriormente.

[0043] En particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 40 respectivamente la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 40 respectivamente la SEQ ID NO: 41;

[0044] Más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 40; y

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 41.

[0045] En otra realización, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial; y
- como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial tal como se especifica anteriormente.

[0046] En particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 40 respectivamente la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 40 o la SEQ ID NO: 41; y

- como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 42 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 42.

[0047] Más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- 5 - una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 40; y
- 10 - una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 41; y
- 15 - una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 42 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 42.

[0048] Incluso más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 40; y
- 30 - una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 41; y
- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 42.

[0049] Más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 40; y
- 40 - una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 41; y
- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 42.

[0050] En otra realización, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial tal como se especifica anteriormente; y
- 50 - como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial, tal como se especifica anteriormente; y
- como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica, tal como se especifica anteriormente.

[0051] En particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 40 respectivamente la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 40 o la SEQ ID NO: 41; y
- 60 - como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 42 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 42 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 42.

% de identidad con la SEQ ID NO: 42; y

- como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 57 respectivamente la SEQ ID NO: 58 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 57 respectivamente la SEQ ID NO: 58.

[0052] Más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 40 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 40; y

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 41; y

- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 42 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 42; y

- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 57 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 57; y

- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 58 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 58.

[0053] Incluso más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 40; y

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 41; y

- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 42; y

- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 57; y

- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 58.

[0054] Más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 40; y

- una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 41; y
- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 42; y
- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 57; y
- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 58.

[0055] En otra realización, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica, tal como se especifica anteriormente.

[0056] En particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 57 respectivamente la SEQ ID NO: 58 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 57 respectivamente la SEQ ID NO: 58.

[0057] Más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 57 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 57; y
- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 58 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo 90 % de identidad, como mínimo 91 % de identidad, como mínimo 92 % de identidad, como mínimo 93 % de identidad, como mínimo 94 % de identidad, como mínimo 95 % de identidad, como mínimo 96 % de identidad, como mínimo 97 % de identidad, como mínimo 98 % de identidad, como mínimo 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 58.

[0058] Incluso más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 57; y
- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que tiene como mínimo 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 58.

[0059] Más en particular, la célula huésped de la invención comprende como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:

- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 57; y
- una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia tal como se establece en la SEQ ID NO: 58.

[0060] En otra realización adicional, la célula huésped de la invención tal como se describe en el presente documento comprende adicionalmente como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una deshidrogenasa de alcohol y/o como mínimo una deshidrogenasa de aldehído. Las realizaciones preferidas de la deshidrogenasa de alcohol y la deshidrogenasa de aldehído son tales como se describen en el presente documento anteriormente.

[0061] Preferiblemente, en una célula huésped de la invención, la deficiencia de la producción de uno o más polipéptidos identificados en el presente documento es una reducción de la producción de como mínimo 20 %, más preferiblemente como mínimo 30 %, más preferiblemente como mínimo 40 %, incluso más preferiblemente

como mínimo 50 %, incluso más preferiblemente como mínimo 60 %, en particular como mínimo 70 %, más en particular como mínimo 80 %, por ejemplo, como mínimo 85 %, por ejemplo, como mínimo 90 %, por ejemplo, como mínimo 95 %, por ejemplo, como mínimo 100 % (en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención, cuando se analiza bajo las condiciones sustancialmente idénticas).

[0062] Preferiblemente, en una célula huésped de la invención, la deficiencia del nivel de expresión del ARNm transcrito a partir de uno o más genes que codifican uno o más polipéptidos identificados en el presente documento es una reducción de expresión de como mínimo 20 %, más preferiblemente como mínimo 30 %, más preferiblemente como mínimo 40 %, incluso más preferiblemente como mínimo 50 %, incluso más preferiblemente como mínimo 60 %, en particular como mínimo 70 %, más en particular como mínimo 80 %, por ejemplo, como mínimo 85 %, por ejemplo, como mínimo 90 %, por ejemplo, como mínimo 95 %, por ejemplo, como mínimo 100 % (en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención, cuando se analiza bajo las condiciones sustancialmente idénticas).

[0063] Preferiblemente, en una célula huésped de la invención, la deficiencia de la actividad de proteína o la actividad específica de proteína de uno o más polipéptidos identificadas en el presente documento es una reducción de actividad o actividad específica de como mínimo 20 %, más preferiblemente como mínimo 30 %, más preferiblemente como mínimo 40 %, incluso más preferiblemente como mínimo 50 %, incluso más preferiblemente como mínimo 60 %, en particular como mínimo 70 %, más en particular como mínimo 80 %, por ejemplo, como mínimo 85 %, por ejemplo, como mínimo 90 %, por ejemplo, como mínimo 95 %, por ejemplo, como mínimo 100 % (en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención, cuando se analiza bajo las condiciones sustancialmente idénticas).

[0064] Preferiblemente, en una célula huésped de la invención, la deficiencia de producto generada por uno o más polipéptidos es una reducción de producción de como mínimo 20 %, más preferiblemente como mínimo 30 %, más preferiblemente como mínimo 40 %, incluso más preferiblemente como mínimo 50 %, incluso más preferiblemente como mínimo 60 %, en particular como mínimo 70 %, más en particular como mínimo 80 %, por ejemplo, como mínimo 85 %, por ejemplo, como mínimo 90 %, por ejemplo, como mínimo 95 %, por ejemplo, como mínimo 100 % (en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención, cuando se analiza bajo las condiciones sustancialmente idénticas).

[0065] Una célula huésped de la invención es capaz de producir ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico.

[0066] Los términos «ácido dicarboxílico» y «dicarboxilato», tales como «ácido succínico» y «succinato», tienen el mismo sentido en el presente documento y se utilizan de manera intercambiable, los primeros siendo la forma hidrogenada de los últimos.

[0067] Tal como se describe anteriormente en el presente documento, una célula huésped de la invención es una célula huésped genéticamente modificada que comprende como mínimo una modificación genética en su genoma (por ejemplo, una eliminación o alteración de una secuencia de nucleótidos endógena u homóloga), provocando de ese modo la deficiencia de como mínimo una etapa enzimática que cataliza la oxidación de un cofactor. Una célula huésped de la invención procede o se genera a partir de una «célula huésped madre» (que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención). La célula huésped madre puede ser una cepa de tipo salvaje o una célula huésped modificada genéticamente. Por ejemplo, una célula huésped madre puede ser cualquier cepa de tipo salvaje que produce ácido dicarboxílico. Alternativamente, una célula huésped madre puede ser cualquier cepa de tipo salvaje de interés que ha sido sometida a un tratamiento mutagénico clásico o transformación de ácido nucleico recombinante en producción de ácido dicarboxílico. Por ejemplo, la célula huésped madre puede contener una construcción de expresión homóloga o heteróloga que codifica un polipéptido involucrado en la producción de ácido dicarboxílico.

[0068] El experto en la técnica conocerá los procedimientos de modificación de una célula, tales como células microbianas, de tal modo que es capaz de producir el polipéptido involucrado en la producción del ácido dicarboxílico. A tal fin, los procedimientos de tecnología genética recombinante se establecen bien en la técnica y se describen en Sambrook y Russel (2001) «Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press o F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology», Green Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987).

[0069] El término «ácido nucleico» tal como se utiliza en el presente documento, incluye referencia a un polímero de desoxirribonucleótido (ADN) o ribonucleótido (ARN), es decir, un polinucleótido, o con forma de cadena única o doble, y a menos que se limite, abarca los análogos conocidos que tienen la naturaleza de nucleótidos naturales en los que hibridan para convertirse en ácidos nucleicos de cadena única de una manera similar a nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ácidos nucleicos de péptido). Un polinucleótido puede tener longitud completa o una secuencia de un gen nativo o heterólogo estructural o regulador. A menos que se indique lo contrario, el término incluye la referencia a la secuencia especificada así como también a la secuencia complementaria de la misma.

[0070] Tal como se utiliza en el presente documento, un «gen» puede hacer referencia a una molécula aislada de ácido nucleico. Por consiguiente, el término «gen», en el contexto de la presente solicitud, no se refiere solamente a secuencias de origen natural.

[0071] El término «heterólogo» tal como se utiliza en el presente documento hace referencia a secuencias de ácido nucleico o aminoácidos de origen no natural en una célula huésped. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos no es idéntica a aquella que exista naturalmente en la célula huésped.

[0072] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «endógeno» u «homólogo» hace referencia a una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de origen natural en una célula huésped.

[0073] Una célula huésped adecuada puede ser una célula procariota. Preferiblemente, la célula procariota es una célula bacteriana. El término «célula bacteriana» incluye tanto microorganismos Gram-negativos como Gram-positivos.

[0074] Se puede seleccionar a las bacterias adecuadas entre, por ejemplo, *Escherichia*, *Anabaena*, *Caulobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium* (*Sinorhizobium*), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus* or *Actinomycetes* tales como *Streptomyces* y *Actinoplanes*. Preferiblemente, la célula bacteriana se selecciona entre el grupo que consiste en *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. halodurans*, *B. pumilus*, *Gluconobacter oxydans*, *Caulobacter crescentus* CB 15, *Methylobacterium extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas zeaxanthinifaciens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Paracoccus denitrificans*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces clavuligerus*, *Sinorhizobium melioli* y *Rhizobium radiobacter*.

[0075] Una célula huésped puede ser una célula huésped eucariota. Preferiblemente, la célula huésped eucariota es una célula de mamífero, insecto, planta, hongo o alga. Más preferiblemente, la célula huésped eucariota es una célula fúngica. Una célula huésped de hongo, por ejemplo, puede pertenecer al género *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Candida*, *Hansenula*, *Humicola*, *Issatchenkia*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Brettanomyces*, *Rhizopus*, *Zygosaccharomyces*, *Pachysolen* o *Yamadazyma*. Una célula fúngica, por ejemplo, puede pertenecer a una especie de *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. carlsbergensis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia stipidis*, *P. pastoris*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sonorensis*, *C. revkaui*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Hansenula polymorpha*, *Issatchenkia orientalis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Rhizopus oryzae* o *Zygosaccharomyces bailii*. En una realización, una célula huésped de hongo de la presente invención es una levadura, que pertenece, por ejemplo, a *Saccharomyces sp.*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*.

[0076] Los ejemplos de células huésped de levaduras incluyen *C. sonorensis*, *K. marxianus*, *K. thermotolerans*, *C. methanobos*, *Saccharomyces bulderi* (*S. bulderi*), *I. orientalis*, *C. lambica*, *C. sorboxylosa*, *C. zemplinina*, *C. geochares*, *P. membranifaciens*, *Z. kombuchaensis*, *C. sorbosivorans*, *C. vanderwaltii*, *C. sorbophila*, *Z. bisporus*, *Z. lentus*, *Saccharomyces bayanus* (*S. bayanus*), *D. castellii*, *C. boidinii*, *C. etchellsii*, *K. lactis*, *P. jadinii*, *P. anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Pichia galeiformis*, *Pichia sp.* YB-4149 (denominación NRRL), *Candida ethanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifaciens*, *P. fermentans* y *Saccharomycopsis crataegensis* (*S. crataegensis*). Las cepas adecuadas de *K. marxianus* y *C. sonorensis* incluyen aquellas descritas en WO 00/71738 A1, WO 02/42471 A2, WO 03/049525 A2, WO 03/102152 A2 y WO 03/102201A2. Las cepas adecuadas de *I. orientalis* son cepas ATCC 32196 cepa ATCC PTA-6648. En la invención, la célula huésped puede ser Crabtree negativa, como una cepa de origen salvaje. El efecto Crabtree se define como la aparición de metabolismo fermentativo bajo las condiciones aeróbicas debido a la inhibición de consumo de oxígeno por un microorganismo cuando se cultiva a altas velocidades específicas de crecimiento (efecto a largo plazo) o en presencia de concentraciones altas de glucosa (efecto a corto plazo). Los fenotipos Crabtree negativos no muestran este efecto, y, por consiguiente, no son capaces de consumir el oxígeno incluso en presencia de concentraciones altas de glucosa o a velocidades altas de crecimiento.

[0077] La célula eucariota puede ser una célula huésped de hongo filamentoso. Los hongos filamentosos incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (tal como se define en Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, R. U.). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared de micelio compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetal que se realiza mediante elongación de hifa y catabolismo de carbono es obligatoriamente aeróbico. Las cepas de hongos filamentosos incluyen, pero no se limitan a, cepas de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Agaricus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Corynascus*, *Chrysosporium*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Monascus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Mortierella*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*,

Piromyces, *Phanerochaete*, *Podospora*, *Pycnoporus*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Sordaria*, *Talaromyces*, *Rasamsonia*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, *Trametes* y *Trichoderma*. Las cepas preferidas de hongos filamentosos que pueden servir como células huésped pertenecen a las especies *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Acremonium chrysogenum*, *Trichoderma reesei*, *Rasamsonia emersonii* (anteriormente conocida como *Talaromyces emersonii*), *Aspergillus sojae*, *Chrysosporium lucknowense*, *Myceliophthora thermophyla*. Las células huésped de referencia para la comparación de características de fermentación de células transformadas y no transformadas incluyen, por ejemplo, *Aspergillus niger* CBS120.49, CBS 513.88, *Aspergillus oryzae* ATCC16868, ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892, *Aspergillus fumigatus* AF293 (CBS101355), *P. chrysogenum* CBS 455.95, *Penicillium citrinum* ATCC 38065, *Penicillium chrysogenum* P2, *Thielavia terrestris* NRRL8126, *Talaromyces emersonii* CBS 124.902, *Rasamsonia emersonii* CBS393.64, *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225, ATCC 48272, *Trichoderma reesei* ATCC 26921, ATCC 56765, ATCC 26921, *Aspergillus sojae* ATCC11906, *Chrysosporium lucknowense* ATCC44006 y los derivados de todas estas cepas.

[0078] Una célula huésped más preferida pertenece al género *Aspergillus*, más preferiblemente la célula huésped pertenece a las especies *Aspergillus niger*. Cuando la célula huésped de acuerdo con la invención es una célula huésped *Aspergillus niger*, la célula huésped es preferiblemente CBS 513.88, CBS124.903 o un derivado de la misma.

[0079] En una realización preferida, una célula huésped es una célula huésped de levadura seleccionada entre el grupo que consiste en cepas *Candida*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*, o una célula huésped de hongo filamentoso seleccionada entre el grupo que consiste en células de hongo filamentoso que pertenecen a una especie de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Rasamsonia*, *Thielavia*, *Fusarium* o *Trichoderma*.

[0080] Una célula huésped de la invención puede comprender una secuencia reductora activa de ácido tricarbólico (TCA). La vía TCA reductora es una de las secuencias primarias mediante las cuales un microorganismo puede producir ácidos dicarboxílicos. En los últimos años, la introducción de la vía TCA reductora en una célula huésped ha demostrado ser la mejor opción económica para la producción (microbiana) de ácidos dicarboxílicos, por ejemplo, ácido succínico.

[0081] En una realización, una célula huésped de la invención se modifica genéticamente para comprender una vía TCA reductora. Es decir, la célula huésped de la invención puede comprender una secuencia reductora recombinante de TCA para la producción de ácido dicarboxílico.

[0082] En otra realización, una célula huésped de la invención se modifica genéticamente para comprender una vía TCA reductora que es activa en el citosol. Es decir, la célula huésped de la invención puede comprender una secuencia reductora recombinante de TCA que es activa en el citosol.

[0083] En este contexto, el término «recombinante» hace referencia al hecho que la secuencia de TCA se genera mediante la tecnología genética recombinante bien establecida en la técnica.

[0084] Las enzimas involucradas en dicha vía TCA reductora pueden ser enzimas homólogas o heterólogas.

[0085] En una realización preferida, dicha vía TCA reductora comprende la conversión de fosfoenolpiruvato o piruvato en succinato.

[0086] Por consiguiente, una célula huésped de la invención puede comprender enzimas homólogas o heterólogas seleccionadas entre el grupo de enzimas que catalizan las reacciones de:

- piruvato a oxalacetato y/o fosfoenolpiruvato a oxalacetato;
- oxalacetato a malato;
- malato a fumarato; y
- fumarato a succinato.

[0087] Una célula huésped de la invención puede comprender adicionalmente un transportador de ácido dicarboxílico que exporta el ácido dicarboxílico, por ejemplo, ácido succínico, desde la parte exterior de la célula hacia el entorno extracelular.

[0088] Por consiguiente, una célula huésped de la invención puede comprender una o más copias de un ácido nucleico que codifica uno o más de una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una piruvato carboxilasa, una malato deshidrogenasa, una fumarasa, una fumarato reductasa y/o un transportador de ácido dicarboxílico.

[0089] Por consiguiente, una célula huésped de la invención puede sobreexpresar una o más copias de un

ácido nucleico que codifica uno o más de una fosfoenolpiruvato carboxicina, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una piruvato carboxilasa, una malato deshidrogenasa, una fumarasa, una fumarato reductasa y/o un transportador de ácido dicarboxílico. Preferiblemente, donde una o más de tales enzimas se sobreexpresan, son activas en el citosol.

[0090] Preferiblemente, una célula huésped de la presente invención es una célula huésped de hongo, por ejemplo, una célula huésped de levadura. Más preferiblemente, la célula huésped fúngica de la invención comprende modificaciones genéticas de acuerdo con las realizaciones preferidas tal como se describe en el presente documento a continuación.

[0091] La célula huésped fúngica de la presente invención puede comprender una modificación genética con una piruvato carboxilasa (PYC) que cataliza la reacción de piruvato a oxalacetato (EC 6.4.1.1). La piruvato carboxilasa puede activarse, por ejemplo, en el citosol tras la expresión del gen. Por ejemplo, la célula huésped fúngica sobreexpresa una piruvato carboxilasa, por ejemplo, se sobreexpresa una piruvato carboxilasa endógena u homóloga. La célula huésped fúngica de acuerdo con la presente invención puede estar modificada genéticamente con una piruvato carboxilasa que tiene como mínimo 70 %, preferiblemente como mínimo 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 16.

[0092] Preferiblemente, la célula huésped fúngica de la presente invención expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicina en el citosol. Preferiblemente, se sobreexpresa una secuencia de nucleótidos que codifica una PEP carboxicina. Preferiblemente la PEP carboxicina (EC 4.1.1.49) es una enzima heteróloga, preferiblemente derivada de bacterias, más preferiblemente la enzima que tiene la actividad de PEP carboxicina deriva de *Escherichia coli*, *Mannheimia sp.*, *Actinobacillus sp.*, o *Anaerobiospirillum sp.*, más preferiblemente *Mannheimia succiniciproducens*. Un gen que codifica una PEP carboxicina puede sobreexpresarse y ser activo en el citosol de una célula fúngica. Preferiblemente, una célula huésped fúngica de acuerdo con la presente invención está modificada genéticamente con una PEP carboxicina que tiene como mínimo 70 %, preferiblemente como mínimo 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

[0093] Preferiblemente, la célula huésped fúngica de la presente invención expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa en el citosol. Preferiblemente se sobreexpresa una secuencia de nucleótidos que codifica una PEP carboxilasa. Preferiblemente, la PEP carboxilasa (EC 4.1.1.31) es una enzima heteróloga, preferiblemente derivada de bacterias.

[0094] En una realización, la célula huésped fúngica de la presente invención además se modifica genéticamente con un gen que codifica una malato deshidrogenasa (MDH) activa en el citosol tras la expresión del gen. La expresión citosólica puede obtenerse mediante la eliminación de una señal de direccionamiento de peroxisomas. La malato deshidrogenasa puede sobreexpresarse. Una MDH citosólica puede ser cualquier malato deshidrogenasa homóloga o heteróloga adecuada, que cataliza la reacción de oxalacetato a malato (EC 1.1.1.37), por ejemplo, derivada de *S. cerevisiae*.

[0095] Preferiblemente, la MDH es MDH3 de *S. cerevisiae*, más preferiblemente una que tiene una eliminación de SKL de extremo C-terminal de tal modo que es activa en el citosol. Preferiblemente, una célula huésped fúngica de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una malato deshidrogenasa que tiene como mínimo 70 %, preferiblemente como mínimo 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15.

[0096] En otra realización, la célula huésped fúngica de la presente invención se modifica genéticamente adicionalmente con un gen que codifica una fumarasa, que cataliza la reacción de ácido málico a ácido fumárico (EC 4.2.1.2). Un gen que codifica fumarasa puede provenir de cualquier origen adecuado, preferiblemente de origen microbiano, por ejemplo, una levadura tal como *Saccharomyces* o un hongo filamentoso, tal como *Rhizopus oryzae*, o una bacteria tal como una *Escherichia coli*. La célula huésped fúngica de la presente invención puede sobreexpresar una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarasa. La fumarasa puede ser activa en el citosol tras la expresión de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo, mediante la eliminación de una señal de direccionamiento a peroxisoma. Se descubrió que la actividad citosólica de una fumarasa provocaba una productividad alta de ácido dicarboxílico por la célula fúngica.

[0097] Preferiblemente, la célula huésped fúngica de la presente invención sobreexpresa una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarasa que tiene como mínimo 70 %, preferiblemente como mínimo 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 70.

[0098] En otra realización, la célula huésped fúngica de la invención se modifica genéticamente con cualquier

gen heterólogo u homólogo adecuado que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), que cataliza la reacción de fumarato a succinato (EC 1.3.1.6). La fumarato reductasa dependiente de NADH puede ser una enzima heteróloga, que puede provenir de cualquier origen adecuado, por ejemplo, bacterias, hongos, protozoos o plantas. Una célula fúngica de la presente divulgación comprende una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), derivada preferiblemente de una *Trypanosoma* sp, por ejemplo, una *Trypanosoma brucei*. En una realización, la fumarato reductasa dependiente de NAD(H) se sobreexpresa y es activa en el citosol, por ejemplo, mediante la eliminación de una señal de direccionamiento a peroxisomas. La célula fúngica puede sobreexpresar un gen que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H).

[0099] Preferiblemente, una célula huésped fúngica de acuerdo con la presente invención se modifica genéticamente con una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) que tiene como mínimo 70 %, preferiblemente como mínimo 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

[0100] En otra realización, la célula huésped fúngica de la presente invención se modifica genéticamente con una variante de polipéptido que tiene actividad de fumarato reductasa tal como se da a conocer en WO2015/086839.

[0101] En otra realización, la célula huésped fúngica de la invención expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína transportadora de ácido dicarboxílico. Preferiblemente, la proteína transportadora de ácido dicarboxílico se sobreexpresa. Una proteína transportadora de ácido dicarboxílico puede ser cualquier proteína homóloga o heteróloga adecuada. Preferiblemente, la proteína transportadora de ácido dicarboxílico es una proteína heteróloga. Una proteína transportadora de ácido dicarboxílico puede derivar de cualquier organismo adecuado, preferiblemente de levadura u hongo tal como *Schizosaccharomyces pombe* o *Aspergillus niger*. Preferiblemente, una proteína transportadora de ácido dicarboxílico es una proteína transportadora de ácido dicarboxílico/transportadora de ácido málico, por ejemplo, de *Aspergillus niger* que tiene como mínimo 70 %, preferiblemente como mínimo 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

[0102] La célula huésped fúngica de la invención puede comprender adicionalmente una modificación genética con un gen que codifica una isocitrato liasa (EC 4.1.3.1), que puede ser cualquier enzima heteróloga u homóloga adecuada. La isocitrato liasa puede obtenerse, por ejemplo, de *Kluyveromyces lactis* o *Escherichia coli*.

[0103] La célula huésped fúngica de la presente invención se modifica genéticamente con una isocitrato liasa que tiene como mínimo 70 %, preferiblemente como mínimo 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 17.

[0104] La célula huésped fúngica de la presente invención puede comprender adicionalmente una modificación genética con una malato sintasa (EC 2.3.3.9). La malato sintasa puede sobreexpresarse y/o ser activa en el citosol, por ejemplo, mediante la eliminación de una señal de direccionamiento a peroxisoma. En el caso de la malato sintasa es una malato sintasa de *S. cerevisiae*, por ejemplo, la malato sintasa originaria se altera mediante la eliminación de la secuencia de SKL carboxi-terminal.

[0105] La célula huésped fúngica de la presente invención se modifica genéticamente con una malato sintasa que tiene como mínimo 70 %, preferiblemente como mínimo 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 18.

[0106] En otra realización, la célula huésped fúngica de la invención divulgada en el presente documento comprende una alteración de un gen que codifica una piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1), que cataliza la reacción de piruvato a acetaldehído.

[0107] La célula huésped de levadura de la presente invención sobreexpresa una secuencia de nucleótidos homóloga o heteróloga que comprende una secuencia que codifica fumarato reductasa y una secuencia de nucleótidos heteróloga que comprende una secuencia que codifica fumarasa. Preferiblemente, la célula huésped fúngica de la presente invención puede sobreexpresar una secuencia de nucleótidos homóloga o heteróloga que comprende una secuencia que codifica uno o más de una PEP carboxinasa, una PEP carboxilasa, una piruvato carboxilasa, una malato deshidrogenasa y/o un transportador de ácido dicarboxílico. Más preferiblemente, donde una o más de tales enzimas se sobreexpresan, son activas en el citosol. Las realizaciones preferidas de las enzimas son tales como se describen en el presente documento a continuación.

[0108] Preferiblemente, una célula huésped fúngica de la presente invención es una célula huésped de levadura. Las realizaciones preferidas de la célula huésped de levadura son tales como se describen en el

presente documento anteriormente para la célula huésped fúngica.

[0109] La expresión citosólica de las enzimas descritas anteriormente puede obtenerse mediante la eliminación de una señal de direccionamiento a peroxisoma o mitocondria. La presencia de una señal de direccionamiento a peroxisoma o mitocondria puede determinarse, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito por Schlüter et al., *Nucleic Acid Research* 2007, 35, D815-D822.

[0110] Las técnicas genéticas estándares, tales como la sobreexpresión de enzimas en las células huésped, la modificación genética de células huésped o las técnicas de hibridación, se conocen bien en la técnica, tal como se describe en Sambrook y Russel (2001) «*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press o F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology», Green Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987). Los procedimientos de transformación, por ejemplo, modificación genética de células huésped fúngicas, se conocen a partir de, por ejemplo, EP-A-0 635 574, WO 98/46772, WO 99/60102 y WO 00/37671, WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635 574 y US 6.265.186.

[0111] Una comparación de secuencias y determinación de porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. El experto en la técnica conocerá el hecho que varios programas informáticos diferentes están disponibles para alinear dos secuencias y determinar la identidad entre las dos secuencias (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff y J. B. Kruskal, (ed.), *Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison*, páginas 1-44 Addison Wesley). Se puede determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch para la alineación de las dos secuencias (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Ambas secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos pueden alinearse mediante el algoritmo. El algoritmo de Needleman-Wunsch ha sido puesto en práctica por el programa informático NEEDLE. Para esta invención se utilizó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. *Trends in Genetics* 16, (6) páginas 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para las secuencias de proteínas se utiliza EBLOSUM62 para la matriz de sustitución. Para la secuencia de nucleótidos, se utiliza EDNAFULL. Los parámetros opcionales utilizados son una penalización por hueco abierto de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,5. El experto en la técnica apreciará que todos estos parámetros diferentes proporcionarán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad general de las dos secuencias no se altera de manera significativa, cuando se utilizan algoritmos diferentes.

[0112] Después de la alineación mediante el programa NEEDLE tal como se describe anteriormente el porcentaje de identidad de secuencias entre una secuencia de búsqueda y una secuencia de la invención se calcula tal como sigue: Número de posiciones correspondientes en la alineación que muestran un aminoácido idéntico o un nucleótido idéntico en ambas secuencias dividido por la longitud total de la alineación después de la resta del número total de huecos en la alineación. Se puede obtener la identidad tal como se define en el presente documento a partir de NEEDLE utilizando la opción NOBRIEF y se etiqueta en el resultado del programa como «longest-identity» (identidad más larga).

[0113] Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención pueden utilizarse adicionalmente como una «secuencia de búsqueda» para realizar una búsqueda en las bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse utilizando los programas blastn y blastx (versión 2.2.31 o superior) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa blastn, puntuación = 100, tamaño de palabra = 11 para obtener las secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden llevarse a cabo con el programa blastx, puntuación = 50, tamaño de palabra = 3 para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas de la invención. Para obtener los alineamientos con huecos con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST, tal como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros preestablecidos de los programas respectivos (por ejemplo, blastx y blastn). Véanse la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

[0114] Se proporciona un procedimiento para mejorar la producción de ácido dicarboxílico en una célula huésped, cuyo procedimiento comprende:

- proporcionar una célula huésped capaz de producir un ácido dicarboxílico; y
- modificar la célula huésped en su genoma que da lugar a una deficiencia en la oxidación de uno o más cofactores,

por consiguiente, mejorar la producción de ácido dicarboxílico en la célula huésped.

[0115] Las realizaciones preferidas de la célula huésped capaz de producir un ácido dicarboxílico y de las modificaciones genéticas que dan como resultado una deficiencia de oxidación de uno o más cofactores son tales como se describen en el presente documento anteriormente.

5 **[0116]** De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento de producción de ácido dicarboxílico cuyo procedimiento comprende la fermentación de la célula huésped de la invención tal como se describe en el presente documento anteriormente, bajo las condiciones adecuadas para la producción del ácido dicarboxílico, y, opcionalmente, la recuperación del ácido dicarboxílico del medio de fermentación.

10 **[0117]** Durante el procedimiento, la célula huésped de la invención se fermenta en un recipiente que comprende un medio de fermentación adecuado. El término fermentar, fermentación o fermentado y similares tal como se utiliza en el presente documento hace referencia a la producción de células (por ejemplo, microbianas) de compuestos, en el presente documento ácidos dicarboxílicos a partir de carbohidratos.

15 **[0118]** Preferiblemente, el producto de fermentación es un ácido dicarboxílico, preferiblemente ácido succínico.

[0119] Una fermentación por lotes se define en el presente documento como una fermentación en la que todos los nutrientes se añaden al inicio de una fermentación.

20 **[0120]** Una fermentación fed-batch es una fermentación por lotes en la que todos los nutrientes se añaden durante la fermentación. Los productos en una fermentación por lotes y fed-batch pueden recogerse en un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, cuando uno o más nutrientes se agotan.

25 **[0121]** Una fermentación continua es una fermentación en la que los nutrientes se añaden de manera continua a la fermentación y en la que los productos se eliminan de la fermentación de manera continua.

30 **[0122]** En una realización, la fermentación de la célula huésped de la invención en el procedimiento de la invención se lleva a cabo bajo las condiciones que limitan carbohidratos. Tal como se utiliza en el presente documento, las condiciones que limitan carbohidratos se definen tal como las que mantienen la concentración de carbohidratos inferior a 10 g/l, por ejemplo, aproximadamente a 5 g/l.

35 **[0123]** El procedimiento de la producción de ácido carboxílico de acuerdo con la presente invención se puede realizar a cualquier volumen y escala adecuados, preferiblemente a escala industrial. Escala industrial se define en el presente documento como un volumen de como mínimo 10 o 100 litros, preferiblemente como mínimo 1 metro cúbico, preferiblemente como mínimo 10 o 100 metros cúbicos, preferiblemente como mínimo 1000 metros cúbicos, normalmente inferior a 10.000 metros cúbicos.

40 **[0124]** Se puede realizar la fermentación de la célula huésped de la invención durante el procedimiento de la invención en cualquier medio de fermentación adecuado que comprende una fuente adecuada de nitrógeno, carbohidrato y otros nutrientes necesarios para el crecimiento y la producción de ácido dicarboxílico en el procedimiento de la invención. Un carbohidrato adecuado durante el procedimiento de fermentación de acuerdo con la invención puede ser glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, sacarosa o maltosa.

45 **[0125]** En una realización, el procedimiento de fermentación se lleva a cabo a una presión parcial de CO₂ entre 5 % y 60 %, preferiblemente aproximadamente 50 %.

50 **[0126]** Normalmente durante el procedimiento de la producción de ácido dicarboxílico el pH se reduce durante la producción de ácido dicarboxílico. Preferiblemente, en el procedimiento de producción de ácido dicarboxílico el pH oscila entre 1 y 5, preferiblemente entre 1,5 y 4,5, más preferiblemente entre 2 y 4.

55 **[0127]** En otra realización preferida, el procedimiento comprende una etapa de precultivo en la célula huésped de la presente invención bajo las condiciones aeróbicas en presencia de un carbohidrato. Preferiblemente, la fermentación de la célula huésped durante el precultivo se lleva a cabo a un pH que oscila entre 4 y 6. Preferiblemente, el carbohidrato durante el precultivo es un carbohidrato no reprimido, preferiblemente galactosa. Se ha descubierto que es beneficioso precultivar las células huésped sobre un carbohidrato no reprimido, dado que esto previene la represión de glucosa, que puede afectar de manera negativa la cantidad de biomasa producida. Adicionalmente, se ha descubierto que una etapa de precultivación de células huésped bajo condiciones aeróbicas da lugar a una producción de biomasa superior y un crecimiento más rápido. Preferiblemente, la precultivación se lleva a cabo en modo por lotes.

60 **[0128]** Normalmente se lleva a cabo una etapa de propagación para generar el aumento de biomasa, preferiblemente bajo las condiciones que limitan a carbohidratos.

65 **[0129]** El procedimiento de producción de ácido dicarboxílico se puede llevar a cabo a cualquier temperatura adecuada. Una temperatura adecuada puede oscilar, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 grados Celsius, por ejemplo, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 grados

Celsius.

[0130] En una realización, el procedimiento se lleva a cabo de tal modo que como mínimo una parte de las células huésped de la presente invención se vuelva a utilizar, es decir, se recicla. Las células huésped pueden reciclarse de nuevo dentro del recipiente original o en un segundo recipiente. Preferiblemente, el medio en el que se introducen las células huésped recicladas se suplementa con una vitamina y/o un elemento traza.

[0131] En una realización preferida, el medio de fermentación comprende una cantidad de ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, de entre 1 y 150 g/l, preferiblemente entre 5 y 100 g/l, más preferiblemente entre 10 y 80 g/l o entre 15 y 60 g/l. En cualquier caso, la célula huésped de la presente invención típicamente será capaz de acumular más ácido dicarboxílico en el medio de fermentación en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención (y cuando se analiza bajo las condiciones sustancialmente idénticas). Típicamente, la célula huésped de la invención mostrará un aumento de título de ácido dicarboxílico, por ejemplo, ácido succínico, de como mínimo 1 %, más preferiblemente de como mínimo 2 %, incluso más preferiblemente de como mínimo 4 %, en particular de como mínimo 5 %, más en particular de como mínimo 6 %, por ejemplo, de como mínimo 8 %, por ejemplo, de como mínimo 10 %, en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención (y cuando se analiza bajo las condiciones sustancialmente idénticas). En este contexto, el título de ácido dicarboxílico (g de ácido dicarboxílico / l de sobrenadante) se calcula dividiendo la cantidad de ácido dicarboxílico producido por el volumen total de sobrenadante de cultivo.

[0132] En una realización preferida adicional, típicamente, la célula huésped de la invención mostrará un aumento en el rendimiento del proceso de fermentación de ácido dicarboxílico, por ejemplo, ácido succínico, de como mínimo 1 %, más preferiblemente de como mínimo 2 %, incluso más preferiblemente de como mínimo 4 %, en particular de como mínimo 5 %, más en particular de como mínimo 6 %, por ejemplo, de como mínimo 8 %, por ejemplo, de como mínimo 10 %, en comparación con la célula huésped madre que no ha sido modificada en su genoma de acuerdo con la invención (y cuando se analiza bajo las condiciones sustancialmente idénticas). En este contexto, el rendimiento del proceso de fermentación de ácido dicarboxílico (g de ácido dicarboxílico / g de glucosa) se calcula dividiendo la cantidad de ácido dicarboxílico producido por la cantidad de azúcares consumidos que se incluyen durante la fase de propagación de biomasa.

[0133] El procedimiento de la producción de ácido dicarboxílico puede comprender adicionalmente la recuperación del ácido dicarboxílico. Se puede realizar la recuperación del ácido dicarboxílico mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, mediante cristalización precipitación de amonio, tecnología de intercambio iónico, centrifugación o filtración o cualquier combinación adecuada de estos procedimientos.

[0134] En una realización preferida, la recuperación del ácido dicarboxílico comprende la cristalización del ácido dicarboxílico y la formación de cristales de ácido dicarboxílico. Preferiblemente, la cristalización del ácido dicarboxílico comprende la eliminación de una parte del medio de fermentación, preferiblemente mediante evaporación para obtener un medio concentrado.

[0135] De acuerdo con la presente invención, se puede recuperar el ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, mediante la cristalización del ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, de la solución acuosa que tiene un pH entre 1 y 5 y que comprende dicho ácido dicarboxílico, que comprende la evaporación de una parte de la solución acuosa para obtener una solución concentrada, disminuyendo la temperatura de la solución concentrada hasta un valor entre 5 y 35 grados Celsius, en donde se forman los cristales de ácido dicarboxílico. Preferiblemente, la cristalización comprende llevar la temperatura del medio concentrado hasta una temperatura entre 10 y 30 grados Celsius, preferiblemente entre 15 y 25 grados Celsius. Preferiblemente, la solución acuosa que comprende el ácido dicarboxílico tiene un pH entre 1,5 y 4,5, preferiblemente entre 2 y 4.

[0136] Se ha descubierto que la cristalización del ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, a temperaturas más altas tales como entre 10 y 30 grados Celsius da lugar a cristales de ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, con una cantidad más baja de impurezas tales como ácido orgánico, proteína, color y/o olor, que los cristales de ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, que se cristalizaron a temperatura baja inferior a 10 grados.

[0137] Otra ventaja de cristalización del ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, a temperaturas más altas es aquella que se necesita una cantidad más baja de energía para enfriar la solución acuosa en comparación con un procedimiento en donde la cristalización del ácido dicarboxílico se lleva a cabo por debajo de 10 o 5 grados Celsius, que da lugar a un procedimiento más económico y sostenible.

[0138] Preferiblemente, la cristalización del ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, comprende una etapa de lavada de los cristales de ácido dicarboxílico. Se puede cristalizar el ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, directamente a partir del medio de fermentación que tiene un pH entre 1 y 5 hasta una pureza de 90 % p/p, preferiblemente como mínimo 95, 96, 97 o como mínimo 98 %, o desde 99 hasta 100 % p/p.

[0139] En una realización preferida, el procedimiento de la producción de ácido dicarboxílico puede comprender adicionalmente el uso del ácido dicarboxílico en un procedimiento industrial.

5 [0140] Preferiblemente, el ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico, que se prepara durante el procedimiento de acuerdo con la presente invención se convierte además en un producto deseado. Un producto deseado puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como ácido succínico de polibutileno (PBS), un agente descongelante, un aditivo alimentario, un aditivo cosmético o un tensioactivo. Es decir, la invención da a
10 conocer un procedimiento de la producción de un producto, por ejemplo, un polímero, tal como ácido succínico de polibutileno (PBS), un agente descongelante, un aditivo alimentario, un aditivo cosmético o un tensioactivo, cuyo procedimiento comprende: producir ácido dicarboxílico tal como se describe en el presente documento; y utilizar dicho ácido dicarboxílico en la producción de dicho producto.

15 [0141] También se da a conocer un uso de una modificación en el genoma de una célula huésped para provocar una deficiencia de como mínimo una etapa enzimática que cataliza la oxidación de un cofactor, aumentando de este modo la producción de ácido dicarboxílico en la célula huésped. Las realizaciones preferidas de las modificaciones genéticas y las células huésped son tales como se describen en el presente documento anteriormente.

20 [0142] La referencia en el presente documento a un documento de patente u otra materia que se proporciona como técnica anterior no debería interpretarse como una admisión de que aquel documento o materia se conocían o que la información que contiene era parte del conocimiento general común como la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

25 [0143] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos:

EJEMPLOS

Materiales y Procedimientos Generales

30 **Procedimientos de ADN**

[0144] Los procedimientos estándares de ADN se llevaron a cabo tal como se describen en otros documentos (Sambrook et al., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) a menos que se indique lo contrario. El ADN se amplificó utilizando la corrección de enzima polimerasa Phusion (Finnzymes). Las enzimas de restricción eran de Invitrogen o New England Biolabs.

40 **Fermentación MTP de cepas de producción de ácido succínico**

[0145] Para determinar la producción de ácido succínico, las cepas se cultivaron por triplicado en placas de microtitulación (MTP) en agitadores de humedad (Infors) durante 3 días a 30 grados a 550 rpm y 80 % de humedad. El medio se basaba en el medio Verduyn (Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Yeast, julio de 1992; 8(7):501-517), pero se realizaron las modificaciones de la fuente de carbono y nitrógeno
45 tal como se describe en el presente documento a continuación.

Tabla 1. Composición de medio de precultivo MTP

Materia prima		Concentración (g/l)
Galactosa	$C_6H_{12}NO_6 \cdot H_2O$	40,00
Urea	$(Na_2)_2CO$	2,30
Dihidrógeno fosfato de potasio	KH_2PO_4	3,00
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50
Solución ^a de elemento traza		1,00
Solución ^b de vitamina		1,00
^a Solución de elementos traza		

ES 2 940 213 T3

Componente	Fórmula	Concentración (g/kg)
EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	15,00
Sulfato de cinc $7H_2O$	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4,50
Cloruro de manganeso $2H_2O$	$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	0,84
Cloruro de cobalto (II) $6H_2O$	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,30
Sulfato de cobre (II) $5H_2O$	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,30
Molibdato de sodio $2H_2O$	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,40
Cloruro de calcio $2H_2O$	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,50
Sulfato de hierro $7H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	3,00
Ácido bórico	H_3BO_3	1,00
Yoduro de potasio	KI	0,10
Biotina (D-)	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	0,05
Pantotenato de Ca D(+)	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	1,00
Ácido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	1,00
Mio-inositol	$C_6H_{12}O_6$	25,00
Clorhidrato de cloruro de tiamina	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS \cdot xH_2O$	1,00
Clorhidrato de pirodoxol	$C_8H_{12}ClNO_3$	1,00
Ácido p-aminobenzoico	$C_7H_7NO_2$	0,20
^b Solución de vitamina		

[0146] Se utilizó un total de 80 microlitros de precultivo para inocular 2,5 ml de medio con 1,5 % de galactosa como una fuente de carbono en bandejas de 24 pocillos. Los cultivos se cultivaron durante 72 horas en agitadores de humedad (Infors) a 30°C, 550 rpm, 80 % de humedad. Después de generar la biomasa, empezó un experimento de producción mediante la resuspensión de las células en 2,5 ml de medio mineral con glucosa como una fuente de carbono. Los cultivos principales se incubaron en agitadores de humedad (Infors) a 30 grados a 550 rpm y 80 % de humedad y se recogieron las muestras 48 horas después de cultivo.

Análisis de metabolitos de muestras MTP mediante RMN

[0147] Para el análisis de metabolitos de muestras MTP, se mezclaron 90 microlitros de sobrenadante de muestras de fermentación con 10 microlitros de RMN estándar (20 g/l de ácido maleico) y 100 microlitros de 10 % de solución D2O. Las muestras se liofilizan y posteriormente se disuelven en 1 mL de D2O.

[0148] Se graban los espectros 1D 1H RMN en un espectrómetro BEST Bruker Avance III, que funciona con una frecuencia de protón de 500MHz, equipado con una sonda criogénica enfriada con He, que utiliza un programa de pulso sin eliminación de agua (ZG) a una temperatura de 300 K, con un pulso de excitación de 90 grados, tiempo de adquisición de 2,0 segundos y un retraso en relajación de 40 segundos. El número de escaneos se estableció en 8, no se utilizan los escaneos simulados.

La concentración de ácido succínico [en g/L] se calcula basándose en las siguientes señales (δ en relación a ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico):

Ácido succínico: señal de ácido succínico a 2,67 ppm (s, 4 H)

La señal utilizada para el estándar: pico de ácido maleico en torno a 6,3 ppm (S, 2 H)

Ejemplo 1: Construcción de cepa SUC-947 de levadura

[0149] La cepa SUC-632 de *Saccharomyces cerevisiae* se construyó tal como se describe en WO2013/004670. La cepa SUC- 632 se utilizó como un punto de partida para construir la cepa SUC-947. La cepa SUC-708 es una mutante de la cepa SUC-632 obtenida mediante el desarrollo de cepas clásicas.

[0150] Un gen de fumarasa de *E. coli* (fumB) se transformó en la cepa SUC-708 tal como se describe a continuación. SEQ ID NO: 1 describe la secuencia de proteína de fumarasa (fumB) de *Escherichia coli* (E.C. 4.2.1.2, número de acceso de UniProt P14407). La secuencia genética era un par de codones optimizado para la expresión en *S. cerevisiae* tal como se da a conocer en la solicitud de patente WO2008/000632. El codón de

terminación TAA se modificó a TAAG. La expresión del gen *FUM_01* se controla mediante el promotor *TDH1* (600 bp directamente antes del codón de inicio del gen *TDH1*) y el terminador *TDH1* (300 bp directamente después del codón de terminación del gen *TDH1*). Las secuencias de promotor *TDH1* y el terminador *TDH1* que controlan la expresión de *FUM_01* son secuencias nativas derivadas de S288C de *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia sintética promotor-gen que incluye sitios de restricción adecuados se sintetizó mediante GenArt (Regensburg, Alemania). Este fragmento sintético forma parte del plásmido pSUC223 (Figura 1). La secuencia completa de pSUC223 se describe en SEQ ID NO: 2. El plásmido pSUC223 contiene un marcador KanMX que facilita la selección de crecimiento en presencia de G418. Se puede eliminar el marcador KanMX, flanqueado por sitios lox66 y lox71 (Albert et al., Plant Journal, 7(4), 649-659), por la acción de recombinasa Cre, tal como se describe en Gueldender et al., (Nucleic Acids Res. 1 de julio de 1996; 24(13):2519-24). Las secuencias TDH1p-fumB- TDH1t y lox66-KanMX-lox71 estaban flanqueadas por las secuencias que facilitan la integración mediante cruzado doble en el sitio YPRCtau3 locus, que se ubica en el cromosoma XVI.

[0151] El plásmido pSUC223 se limitó utilizando las enzimas de restricción ApaI y *XhoI*. Se eliminó un fragmento 5.408 bp que contiene el flanco 5' YPRCtau3, la construcción sintética fumB, el marcador de selección KanMX flanqueado por los sitios lox66 y lox71 y el flanco 3' YPRCtau3 de un gel de agarosa y se purificó utilizando el Kit de Recuperación de ADN en Gel Zymoclean™ (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0152] El fragmento se transformó en la cepa SUC-708. Los transformantes se seleccionaron en las placas con 2 % de galactosa Yeast Extract BactoPeptone (YEP) suplementadas con 200 µg de G418/mililitro para la selección de transformantes que contenían el marcador KanMX, que producían múltiples transformantes. Se confirmó la presencia del gen fumB introducido mediante PCR que utiliza las secuencias de cebadores que pueden aparearse con las secuencias codificadoras del ORF codificadas por la SEQ ID NO: 2. Uno de los transformantes apropiados, SUC-708 *FUM_01* #3, se denominó SUC-813.

[0153] Fumarato reductasa *FRD1* de *S. cerevisiae* codificada por *YEL047C*, E.C. 1.3.1.6, número de acceso de UniProt P32614, se analizó para la presencia de secuencias de señalización utilizando SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen et al., 2004, Mol. Biol., 340:783-795) y TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson et al., 2007, Nature Protocols 2, 953-971). La proteína Frd1 de *S. cerevisiae* tiene múltiples localizaciones posibles. Contiene un péptido de señal de 19 aminoácidos. Después de la eliminación del SP putativo, se aumentó de manera drástica la tendencia prevista para la localización citosólica. La variante que suprime el péptido de señal de 19 aminoácidos se describe en la SEQ ID NO: 3, que se sometió al procedimiento de codón-par tal como se describe en WO2008/000632 para la expresión en *S. cerevisiae*. El codón de terminación TAA se modificó a TAAG. La expresión del gen *FRD1* se controla mediante el promotor TDH3 (600 bp directamente antes del codón de inicio del gen TDH3) y el terminador TDH3 (300 bp directamente después del codón de terminación del gen TDH3). Las secuencias del promotor TDH3 y el terminador TDH3 que controlan la expresión de *FRD1* son secuencias nativas derivadas de S288C de *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia sintética de promotor-gen que incluye los sitios de restricción adecuados se sintetizó mediante DNA2.0 (Menlo Park, CA, EE. UU.) y se describe en la SEQ ID NO: 4.

[0154] El gen *FRD1* modificado se transformó en la cepa SUC-813 tal como se muestra en la Figura 2. El gen *FRD1* modificado reemplazó el gen PDC6 en la cepa SUC-813 utilizando el método de «integración partida de recombinasa Cre» o «integración directa de recombinasa Cre» (DCI) tal como se describe en PCT/EP2013/055047. Se generaron los fragmentos de PCR utilizando ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó el fragmento 1 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6, utilizando un plásmido de clonación de DNA 2.0 que contenía la SEQ ID NO: 4 como modelo. SEQ ID NO: 5 contiene una superposición de 66 bp con la región del extremo 5' del gen PDC6, ubicado justo antes del codón de inicio del gen PDC6. Se generó el fragmento 2 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8 utilizando un plásmido pSUC228 (Figura 3, SEQ ID NO: 9) como modelo. Plásmido pSUC228 es una versión modificada de pSUC227, que se describe en PCT/EP2013/055047. Plásmido pSUC227 contiene un marcador KanMX, que se sustituye por un marcador de nourseotricina (natMX4) (Goldstein y McCusker, Yeast. octubre de 1999; 15(14):1541-53) que da lugar a pSUC228. Se generó el fragmento 3 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11, utilizando pSUC225 (descrito en PCT/EP2013/055047) como modelo. SEQ ID NO: 11 contiene una superposición de 64 bp con la región del extremo 3' del gen PDC6, ubicado justo después del codón de terminación del gen PDC6.

[0155] El tamaño de los fragmentos de PCR se comprobó mediante las técnicas estándar de electroforesis en agarosa. Los fragmentos de ADN amplificados con PCR se purificaron utilizando el Kit de Recuperación de ADN en Gel Zymoclean™ (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones de fabricante.

[0156] La transformación de levadura se realizó mediante un procedimiento conocido por los expertos. La cepa SUC-813 de *S. cerevisiae* se transformó con los fragmentos 1, 2 y 3 purificados mediante PCR. El fragmento

1 de PCR contenía una superposición con el fragmento 2 de PCR en su extremo 3'. El fragmento 3 de PCR contenía una superposición con el fragmento 2 de PCR en su extremo 5'. El fragmento 2 de PCR contenía una superposición en su extremo 5' con el fragmento 1 de PCR y su extremo 3' con el fragmento 3 de PCR, de tal modo que esto facilitó la recombinación homóloga de todos tres fragmentos de PCR (Figura 2). El extremo 5' del fragmento 1 de PCR y el extremo 3' del fragmento 3 de PCR eran homólogos con el locus PDC6 y facilitaron la integración de todos tres fragmentos de PCR en el locus PDC6. Esto generó un fragmento lineal que consistía en fragmentos 1 hasta 3 de PCR integrados en el locus PDC6 (Figura 2). Este procedimiento de integración se describe en la solicitud de patente WO2013/076280.

[0157] Las mezclas de transformaciones se colocaron en bandejas sobre YPD-agar (por litro: 10 gramos de extracto de levadura, 20 gramos por litro de peptona, 20 gramos por litro de dextrosa, 20 gramos de agar) que contenían 100 µg de nourseotricina (Jena Bioscience, Alemania) por ml. De tres a cinco días después de crecimiento a 30°C, los transformantes individuales se volvieron a extender sobre las placas de YPD-agar frescas que contenían 100 µg de nourseotricina por ml.

[0158] Por consiguiente, el casete de marcador y recombinasa Cre se eliminaron de manera eficaz utilizando recombinación mediante el procedimiento descrito en PCT/EP2013/055047, que dio lugar a la sustitución del gen PDC6 por la SEQ ID NO: 4 y dejó un sitio *lox72* como resultado de la recombinación entre los sitios *lox66* y *lox71*. Debido a la actividad de recombinasa Cre, el marcador KanMX flanqueado por los sitios *lox66* y *lox71*, que fue introducido en el ADN genómico para crear la cepa SUC-813 también fue eliminado de manera eficiente. La cepa resultante libre de marcador se denominó SUC-947. La cepa SUC-947 fue capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar, pero no fue capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar suplementadas o con 200 µg de G418/ml o 100 µg/ml de nourseotricina o ambos, lo que confirma la eliminación tanto del marcador KanMX como natMX4.

Ejemplo 2: Construcción de cepa SUP-003 de levadura y producción de ácido succínico por SUP-003

Generación de fragmentos de PCR

[0159] Se generaron los fragmentos de PCR utilizando ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó el fragmento 4 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 21 contiene una superposición de 27 bp con la región del extremo 5' del gen GUT2, ubicado justo antes del codón de inicio del gen GUT2. Se generó el fragmento 5 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24, utilizando un plásmido pSUC227 (Figura 5, SEQ ID NO: 43) como modelo. Se generó el fragmento 6 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 25, utilizando un plásmido pSUC225 (Figura 6, SEQ ID NO: 44) como modelo. Se generó el fragmento 7 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 26 y la SEQ ID NO: 27, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 26 contiene una superposición de 29 bp con la región del extremo 3' del gen GUT2, ubicado justo después del codón de terminación del gen GUT2.

[0160] El tamaño de los fragmentos de PCR se comprobó mediante las técnicas estándar de electroforesis en agarosa. Los fragmentos de ADN amplificados con PCR se purificaron utilizando el Kit de Recuperación de ADN en Gel Zymoclean™ (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones de fabricante.

Transformación en cepa SUC-947 para construir la cepa SUP-003

[0161] La cepa SUC-947 de *Saccharomyces cerevisiae* se construyó tal como se describe en el Ejemplo 1. La cepa SUC-947 se utilizó como un punto de partida para construir la cepa SUP-003.

[0162] La transformación de levadura se realizó mediante un procedimiento conocido por los expertos. La cepa SUC-947 de *S. cerevisiae* se transformó con los fragmentos 4, 5, 6 y 7 purificados mediante PCR. El fragmento 4 de PCR contenía una superposición con el fragmento 5 de PCR en su extremo 3'. El fragmento 7 de PCR contenía una superposición con el fragmento 6 de PCR en su extremo 5'. El fragmento 5 de PCR contenía una superposición en su extremo 5' con el fragmento 4 de PCR y en su extremo 3' con el fragmento 6 de PCR, y el fragmento 6 de PCR contenía una superposición en su extremo 5' con el fragmento 5 de PCR y su extremo 3' con el fragmento 7 de PCR, de tal modo que esto facilitó la recombinación homóloga de todos cuatro fragmentos de PCR (Figura 4). El extremo 5' del fragmento 4 de PCR y el extremo 3' del fragmento 7 de PCR eran homólogos con el locus GUT2 y facilitaron la integración de todos cuatro fragmentos de PCR en el locus GUT2. Esto generó un fragmento lineal que consistía en fragmentos 4 hasta 7 de PCR integrados en el locus GUT2 (Figura 4). Este procedimiento de integración se describe en el Ejemplo 1.

[0163] Las mezclas de transformaciones se colocaron en bandejas sobre YPD-agar (por litro: 10 gramos de extracto de levadura, 20 gramos por litro de peptona, 20 gramos por litro de dextrosa, 20 gramos de agar) que contenían 200 µg de G418 por ml. De tres a cinco días después de crecimiento a 30°C, los transformantes

individuales se volvieron a extender sobre las placas de YPD-agar frescas que contenían 200 µg de G418 por ml.

[0164] Por consiguiente, el casete de marcador y recombinasa Cre se eliminan de manera eficaz utilizando recombinación mediante el procedimiento descrito en PCT/EP2013/055047, que da lugar a la eliminación del gen GUT2 y el abandono del sitio lox72 como resultado de recombinación entre los sitios lox66 y lox71. La cepa resultante libre de marcador se denominó SUP-003. La cepa SUC-003 fue capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar, pero no fue capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar suplementadas con 200 µg de G418/ml, lo que confirma la eliminación del marcador KanMX.

Producción de ácido succínico por SUP-003

[0165] Se llevó a cabo un experimento de producción de ácido succínico y se midieron los títulos de ácido succínico tal como se describe en Materiales y procedimientos generales. En el sobrenadante de SUP-003, se detectó 2,5 % más de ácido succínico en comparación con el sobrenadante de SUC-947, tal como se determinó en fermentaciones con placas de microtitulación.

Ejemplo 3: Construcción de cepa SUP-001 de levadura y producción de ácido succínico por SUP-001

Generación de fragmentos de PCR

[0166] Se generaron los fragmentos de PCR utilizando ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó el fragmento 8 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 35, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 35 contiene una superposición de 27 bp con la región del extremo 5' del gen NDE1, ubicado justo antes del codón de inicio del gen NDE1. Se generó el fragmento 9 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 38, utilizando un plásmido pSUC227 (Figura 5, SEQ ID NO: 43) como modelo. Se generó el fragmento 10 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 39, utilizando un plásmido pSUC225 (Figura 6, SEQ ID NO: 44) como modelo. Se generó el fragmento 11 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 36 y la SEQ ID NO: 37, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 36 contiene una superposición de 18 bp con la región del extremo 3' del gen NDE1, ubicado justo después del codón de terminación del gen NDE1.

[0167] El tamaño de los fragmentos de PCR se comprobó mediante las técnicas estándar de electroforesis en agarosa. Los fragmentos de ADN amplificados con PCR se purificaron utilizando el Kit de Recuperación de ADN en Gel Zymoclean™ (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones de fabricante.

Transformación en cepa SUC-947 para construir la cepa SUP-001

[0168] La cepa SUC-947 de *Saccharomyces cerevisiae* se construyó tal como se describe en el Ejemplo 1. La cepa SUC-947 se utilizó como un punto de partida para construir la cepa SUP-001.

[0169] La transformación de levadura se realizó mediante un procedimiento conocido por los expertos. La cepa SUC-947 de *S. cerevisiae* se transformó con los fragmentos 8, 9, 10 y 11 purificados mediante PCR. El fragmento 8 de PCR contenía una superposición con el fragmento 9 de PCR en su extremo 3'. El fragmento 11 de PCR contenía una superposición con el fragmento 10 de PCR en su extremo 5'. El fragmento 9 de PCR contenía una superposición en su extremo 5' con el fragmento 8 de PCR y en su extremo 3' con el fragmento 10 de PCR, y el fragmento 10 de PCR contenía una superposición en su extremo 5' con el fragmento 9 de PCR y su extremo 3' con el fragmento 11 de PCR, de tal modo que esto facilitó la recombinación homóloga de todos cuatro fragmentos de PCR (Figura 4). El extremo 5' del fragmento 8 de PCR y el extremo 3' del fragmento 11 de PCR eran homólogos con el locus NDE1 y facilitaron la integración de todos cuatro fragmentos de PCR en el locus NDE1. Esto generó un fragmento lineal que consistía en fragmentos 8 hasta 11 de PCR integrados en el locus NDE1 (Figura 7). Este procedimiento de integración se describe en el Ejemplo 1.

[0170] Las mezclas de transformaciones se colocaron en bandejas sobre YPD-agar (por litro: 10 gramos de extracto de levadura, 20 gramos por litro de peptona, 20 gramos por litro de dextrosa, 20 gramos de agar) que contenían 200 µg de G418 por ml. De tres a cinco días después de crecimiento a 30°C, los transformantes individuales se volvieron a extender sobre las placas de YPD-agar frescas que contenían 200 µg de G418 por ml.

[0171] Por consiguiente, el casete de marcador y recombinasa Cre se eliminan de manera eficaz utilizando recombinación mediante el procedimiento descrito en PCT/EP2013/055047, que da lugar a la eliminación del gen NDE1 y el abandono del sitio lox72 como resultado de recombinación entre los sitios lox66 y lox71. La cepa resultante libre de marcador se denominó SUP-001. La cepa SUC-001 fue capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar, pero no fue capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar suplementadas con 200 µg de G418/ml,

lo que confirma la eliminación del marcador KanMX.

Producción de ácido succínico por SUP-001

- 5 **[0172]** Se llevó a cabo un experimento de producción de ácido succínico y se midieron los títulos de ácido succínico tal como se describe en Materiales y procedimientos generales. En el sobrenadante de SUP-001, se detectó 5 % más de ácido succínico en comparación con el sobrenadante de SUC-947, tal como se determinó en fermentaciones con placas de microtitulación.

10 **Ejemplo 4: Construcción de cepa SUP-002 de levadura y producción de ácido succínico por SUP-002**

Generación de fragmentos de PCR

- 15 **[0173]** Se generaron los fragmentos de PCR utilizando ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó el fragmento 12 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 28 y la SEQ ID NO: 29, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 29 contiene una superposición de 27 bp con la región del extremo 5' del gen NDE2, ubicado justo antes del codón de inicio del gen NDE2. Se generó el fragmento 13 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 32, utilizando un plásmido pSUC227 (Figura 5, SEQ ID NO: 43) como modelo. Se generó el fragmento 14 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 33, utilizando un plásmido pSUC225 (Figura 6, SEQ ID NO: 44) como modelo. Se generó el fragmento 15 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 31, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 30 contiene una superposición de 26 bp con la región del extremo 3' del gen NDE2, ubicado justo después del codón de terminación del gen NDE2.

- 25 **[0174]** El tamaño de los fragmentos de PCR se comprobó mediante las técnicas estándar de electroforesis en agarosa. Los fragmentos de ADN amplificados con PCR se purificaron utilizando el Kit de Recuperación de ADN en Gel Zymoclean™ (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones de fabricante.

30 Transformación en cepa SUC-947 para construir la cepa SUP-002

- 35 **[0175]** La cepa SUC-947 de *Saccharomyces cerevisiae* se construyó tal como se describe en el Ejemplo 1. La cepa SUC-947 se utilizó como un punto de partida para construir la cepa SUP-002.

- 40 **[0176]** La transformación de levadura se realizó mediante un procedimiento conocido por los expertos. La cepa SUC-947 de *S. cerevisiae* se transformó con los fragmentos 12, 13, 14 y 15 purificados mediante PCR. El fragmento 12 de PCR contenía una superposición con el fragmento 13 de PCR en su extremo 3'. El fragmento 15 de PCR contenía una superposición con el fragmento 14 de PCR en su extremo 5'. El fragmento 13 de PCR contenía una superposición en su extremo 5' con el fragmento 12 de PCR y en su extremo 3' con el fragmento 14 de PCR, y el fragmento 14 de PCR contenía una superposición en su extremo 5' con el fragmento 13 de PCR y su extremo 3' con el fragmento 15 de PCR, de tal modo que esto facilitó la recombinación homóloga de todos cuatro fragmentos de PCR (Figura 8). El extremo 5' del fragmento 12 de PCR y el extremo 3' del fragmento 15 de PCR eran homólogos con el locus NDE2 y facilitaron la integración de todos cuatro fragmentos de PCR en el locus NDE2. Esto generó un fragmento lineal que consistía en fragmentos 12 hasta 15 de PCR integrados en el locus NDE2 (Figura 8). Este procedimiento de integración se describe en el Ejemplo 1.

- 45 **[0177]** Las mezclas de transformaciones se colocaron en bandejas sobre YPD-agar (por litro: 10 gramos de extracto de levadura, 20 gramos por litro de peptona, 20 gramos por litro de dextrosa, 20 gramos de agar) que contenían 200 µg de G418 por ml. De tres a cinco días después de crecimiento a 30°C, los transformantes individuales se volvieron a extender sobre las placas de YPD-agar frescas que contenían 200 µg de G418 por ml.

- 50 **[0178]** Por consiguiente, el casete de marcador y recombinasa Cre se eliminan de manera eficaz utilizando recombinación mediante el procedimiento descrito en PCT/EP2013/055047, que da lugar a la eliminación del gen NDE2 y el abandono del sitio lox72 como resultado de recombinación entre los sitios lox66 y lox71. La cepa resultante libre de marcador se denominó SUP-002. La cepa SUP-002 fue capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar, pero no fue capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar suplementadas con 200 µg de G418/ml, lo que confirma la eliminación del marcador KanMX.

60 Producción de ácido succínico por SUP-002

- 65 **[0179]** Se llevó a cabo un experimento de producción de ácido succínico y se midieron los títulos de ácido succínico tal como se describe en Materiales y procedimientos generales. En el sobrenadante de SUP-002, se detectó 2,3 % más de ácido succínico en comparación con el sobrenadante de SUC-947, tal como se determinó en fermentaciones con placas de microtitulación.

Ejemplo 5: Construcción de cepa SUP-004 de levaduraTransformación de cepa SUP-001 para construir la cepa SUP-004

[0180] La cepa SUP-001 de *Saccharomyces cerevisiae* se construyó tal como se describe en el Ejemplo 3. La cepa SUP-001 se utilizó como un punto de partida para construir la cepa SUP-004. SUP-001 contiene una supresión de NDE1. Para generar una doble supresión de NDE1, NDE2, se eliminó NDE2 en SUP-001 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

Ejemplo 6: Construcción de cepa SUP-005 de levaduraTransformación de cepa SUP-004 para construir la cepa SUP-005

[0181] La cepa SUP-004 de *Saccharomyces cerevisiae* se construyó tal como se describe en el Ejemplo 5. La cepa SUP-004 se utilizó como un punto de partida para construir la cepa SUP-005. SUP-004 contiene una doble supresión de NDE1 y NDE2. Para generar una triple supresión de NDE1, NDE1, GUT2, se eliminó GUT2 en SUP-004 de acuerdo con el procedimiento tal como se describe en el Ejemplo 2, generando de este modo SUP-005.

Ejemplo 7: Construcción de cepa SUP-006 de levaduraGeneración de fragmentos de PCR

[0182] Se generan los fragmentos de PCR utilizando ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se genera el fragmento 16 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 45 y la SEQ ID NO: 46, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 46 contiene una superposición de 27 bp con la región del extremo 5' del gen GPD1, ubicado justo antes del codón de inicio del gen GPD1. Se genera el fragmento 17 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 47 y la SEQ ID NO: 22, utilizando un plásmido pSUC227 (Figura 5, SEQ ID NO: 43) como modelo. Se genera el fragmento 18 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 48, utilizando un plásmido pSUC225 (Figura 6, SEQ ID NO: 44) como modelo. Se genera el fragmento 19 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 49 y la SEQ ID NO: 50, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 49 contiene una superposición de 26 bp con la región del extremo 3' del gen GPD1, ubicado justo después del codón de terminación del gen GPD1.

[0183] El tamaño de los fragmentos de PCR se comprueba mediante las técnicas estándar de electroforesis en agarosa. Los fragmentos de ADN amplificados con PCR se purificaron utilizando el Kit de Recuperación de ADN en Gel Zymoclean™ (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones de fabricante.

Transformación de cepa SUP-005 para construir la cepa SUP-006

[0184] La cepa SUP-005 de *Saccharomyces cerevisiae* se construye tal como se describe en el Ejemplo 6. La cepa SUP-005 se utiliza como un punto de partida para construir la cepa SUP-006.

[0185] La transformación de levadura se realiza mediante un procedimiento conocido por los expertos. La cepa SUP-005 de *S. cerevisiae* se transforma con los fragmentos 16, 17, 18 y 19 purificados mediante PCR. El fragmento 16 de PCR contiene una superposición con el fragmento 17 de PCR en su extremo 3'. El fragmento 19 de PCR contiene una superposición con el fragmento 18 de PCR en su extremo 5'. El fragmento 17 de PCR contiene una superposición en su extremo 5' con el fragmento 16 de PCR y en su extremo 3' con el fragmento 18 de PCR, y el fragmento 18 de PCR contiene una superposición en su extremo 5' con el fragmento 17 de PCR y su extremo 3' con el fragmento 19 de PCR, de tal modo que esto facilita la recombinación homóloga de todos cuatro fragmentos de PCR (Figura 9). El extremo 5' del fragmento 16 de PCR y el extremo 3' del fragmento 19 de PCR son homólogos con el locus GPD1 y facilitan la integración de todos cuatro fragmentos de PCR en el locus GPD1. Esto genera un fragmento lineal que consiste en fragmentos 16 hasta 19 de PCR integrados en el locus GPD1 (Figura 9). Este procedimiento de integración se describe en el Ejemplo 1.

[0186] Las mezclas de transformaciones se colocan en bandejas sobre YPD-agar (por litro: 10 gramos de extracto de levadura, 20 gramos por litro de peptona, 20 gramos por litro de dextrosa, 20 gramos de agar) que contienen 200 µg de G418 por ml. De tres a cinco días después de crecimiento a 30°C, los transformantes individuales se vuelven a extender sobre las placas de YPD-agar frescas que contienen 200 µg de G418 por ml.

[0187] Por consiguiente, el casete de marcador y recombinasa Cre se eliminan de manera eficaz utilizando recombinación mediante el procedimiento descrito en PCT/EP2013/055047, que da lugar a la eliminación del gen GPD1 y el abandono del sitio lox72 como resultado de recombinación entre los sitios lox66 y lox71. La cepa

resultante libre de marcador se denomina SUP-006. La cepa SUC-006 es capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar, pero no es capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar suplementadas con 200 µg de G418/ml, lo que confirma la eliminación del marcador KanMX.

5 **Ejemplo 8: Construcción de cepa SUP-007 de levadura**

Generación de fragmentos de PCR

[0188] Se generan los fragmentos de PCR utilizando ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se genera el fragmento 20 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 51 y la SEQ ID NO: 52, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 52 contiene una superposición de 27 bp con la región del extremo 5' del gen GPD2, ubicado justo antes del codón de inicio del gen GPD2. Se genera el fragmento 21 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 53 y la SEQ ID NO: 22, utilizando un plásmido pSUC227 (Figura 5, SEQ ID NO: 43) como modelo. Se genera el fragmento 22 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 54, utilizando un plásmido pSUC225 (Figura 6, SEQ ID NO: 44) como modelo. Se genera el fragmento 23 de PCR utilizando las secuencias de cebadores descritas en la SEQ ID NO: 55 y la SEQ ID NO: 56, utilizando ADN genómico como modelo. SEQ ID NO: 55 contiene una superposición de 26 bp con la región del extremo 3' del gen GPD2, ubicado justo después del codón de terminación del gen GPD2.

[0189] El tamaño de los fragmentos de PCR se comprueba mediante las técnicas estándar de electroforesis en agarosa. Los fragmentos de ADN amplificados con PCR se purifican utilizando el Kit de Recuperación de ADN en Gel Zymoclean™ (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones de fabricante.

Transformación de cepa SUP-006 para construir la cepa SUP-007

[0190] La cepa SUP-006 de *Saccharomyces cerevisiae* se construye tal como se describe en el Ejemplo 7. La cepa SUP-006 se utiliza como un punto de partida para construir la cepa SUP-007.

[0191] La transformación de levadura se realiza mediante un procedimiento conocido por los expertos. La cepa SUP-006 de *S. cerevisiae* se transforma con los fragmentos 20, 21, 22 y 23 purificados mediante PCR. El fragmento 20 de PCR contiene una superposición con el fragmento 21 de PCR en su extremo 3'. El fragmento 23 de PCR contiene una superposición con el fragmento 22 de PCR en su extremo 5'. El fragmento 21 de PCR contiene una superposición en su extremo 5' con el fragmento 20 de PCR y en su extremo 3' con el fragmento 22 de PCR, y el fragmento 22 de PCR contiene una superposición en su extremo 5' con el fragmento 21 de PCR y su extremo 3' con el fragmento 23 de PCR, de tal modo que esto facilita la recombinación homóloga de todos cuatro fragmentos de PCR (Figura 10). El extremo 5' del fragmento 20 de PCR y el extremo 3' del fragmento 23 de PCR son homólogos con el locus GPD2 y facilitan la integración de todos cuatro fragmentos de PCR en el locus GPD2. Esto genera un fragmento lineal que consiste en fragmentos 20 hasta 23 de PCR integrados en el locus GPD2 (Figura 9). Este procedimiento de integración se describe en el Ejemplo 1.

[0192] Las mezclas de transformaciones se colocan en bandejas sobre YPD-agar (por litro: 10 gramos de extracto de levadura, 20 gramos por litro de peptona, 20 gramos por litro de dextrosa, 20 gramos de agar) que contienen 200 µg de G418 por ml. De tres a cinco días después de crecimiento a 30°C, los transformantes individuales se vuelven a extender sobre las placas de YPD-agar frescas que contienen 200 µg de G418 por ml.

[0193] Por consiguiente, el casete de marcador y recombinasa Cre se eliminan de manera eficaz utilizando recombinación mediante el procedimiento descrito en PCT/EP2013/055047, que da lugar a la eliminación del gen GPD2 y el abandono del sitio lox72 como resultado de recombinación entre los sitios lox66 y lox71. La cepa resultante libre de marcador se denomina SUP-007. La cepa SUC-007 es capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar, pero no es capaz de crecer sobre las placas de YPD-agar suplementadas con 200 µg de G418/ml, lo que confirma la eliminación del marcador KanMX.

Ejemplo 9: Producción de ácido succínico en SUP-005 y SUP-007

[0194] Las cepas SUC-947, SUP-005 y SUP-007 de levadura se cultivan en un frasco de agitación (50 ml) durante 3 días a 30°C y 280 rpm. El medio se basa en Verduyn *et al.* (Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Yeast, julio de 1992; 8(7):501-517), con modificaciones de fuentes de carbono y nitrógeno, tal como se describe en el presente documento a continuación.

Tabla 2. Composición de medio de pre-cultivo

Materia prima		Concentración (g/kg)
Galactosa	$C_6H_{12}NO_6 \cdot H_2O$	20,00
Urea	$(Na_2)_2CO$	2,30
Dihidrógeno fosfato de potasio	KH_2PO_4	3,00
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50
Solución ^a de elemento traza		1,00
Solución ^b de vitamina		1,00
Tiza	$CaCO_3$	1,00
^a Solución de elementos traza		

Componente	Fórmula	Concentración (g/kg)
EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	15,00
Sulfato de cinc $7H_2O$	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4,50
Cloruro de manganeso $2H_2O$	$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	0,84
Cloruro de cobalto (II) $6H_2O$	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,30
Sulfato de cobre (II) $5H_2O$	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,30
Molibdato de sodio $2H_2O$	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,40
Cloruro de calcio $2H_2O$	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,50
Sulfato de hierro $7H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	3,00
Ácido bórico	H_3BO_3	1,00
Yoduro de potasio	KI	0,10
Solución de vitamina		

Componente	Fórmula	Concentración (g/kg)
Biotina (D-)	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	0,05
Pantotenato de Ca D(+)	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	1,00
Ácido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	1,00
Mio-inositol	$C_6H_{12}O_6$	25,00
Clorhidrato de cloruro de tiamina	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS \cdot XH_2O$	1,00
Clorhidrato de pirodoxol	$C_8H_{12}ClNO_3$	1,00
Ácido p-aminobenzoico	$C_7H_7NO_2$	0,20

- 5 **[0195]** Seguidamente, se transfieren ~3 ml del contenido del frasco de agitación en un fermentador de gérmenes (volumen inicial 0,3 kg, 1 % de fuerza de inoculación), que contiene el medio expuesto en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de medio del fermentador de gérmenes

Sulfato de amonio	$(NH_4)_2SO_4$	1,00
Dihidrógeno fosfato de potasio	KH_2PO_4	10,00
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Solución de elemento traza		8,00
Solución de vitamina		8,00

[0196] El pH se controla a una concentración de 5,0 mediante la adición de amoníaco (10 % en peso). La temperatura se controla a 30°C. pO_2 se controla a 25 % (en relación a saturación de aire) ajustando la velocidad de agitador. El flujo de aire total empleado es de 18 NL/h. La concentración de glucosa se mantiene limitada regulando la alimentación en el fermentador (se aplicó el exponente de 0,15).

[0197] Después de 68 horas de fermentación, se transfirieron 80 g de caldo de cultivo a un fermentador de producción (volumen inicial 0,4 kg), con el medio mencionado en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de medio del fermentador de producción

Materia prima		Concentración g/kg
Urea	$(Na_2)_2CO$	1,00
Dihidrógeno fosfato de potasio	KH_2PO_4	1,50
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50
Sulfato de hierro. $7H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,006
Tiza	$CaCO_3$	12,50
Biotina	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	0,001

[0198] No se aplica ningún control de pH, dado que $CaCO_3$ añadido reguló desde el principio el medio a una concentración de pH de 5-5,5. Como resultado de la acidificación natural el pH cae hacia 3 al final de fermentación. La temperatura se controla a 30°C. El flujo de gas total aplicado es de 12 NL/h, 50 % de aire y 50 % de CO_2 . La concentración de glucosa se mantiene limitada por la alimentación controlada (concentración de glucosa durante la alimentación fue de 423 g/kg) del fermentador (0-9h: 5,6 ml/h g/L/h; >9h: alimentación en ml/h = $(0,0003 \cdot t)^2 - 0,1028 \cdot t + 7,8991$)^{4/5}). Cuando sea necesario, estos coeficientes se ajustan debidamente.

[0199] Glucosa y ácido succínico se analizan con RMN después de un periodo de fermentación de 48 horas. Los sobrenadantes de las muestras de fermentación se diluyen dos veces (1:1) en agua MilliQ.

[0200] Se pesan con precisión aproximadamente 500 mg de muestra en un recipiente adecuado, y se pesan aproximadamente 500 mg de solución estándar interna (que contiene 10 g/L de ácido maleico en D_2O) en este recipiente. Seguidamente, el recipiente se coloca en un baño de agua precalentada (100 grados) y las muestras se ponen a hervir durante 10 minutos. El material se liofiliza y se disuelve en 1 mL de D_2O que contiene cantidades residuales de DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico).

[0201] Los espectros 1D 1H RMN se graban en un espectrómetro BEST Bruker Avance III, que funciona con una frecuencia de protón de 500MHz, equipado con una sonda criogénica enfriada con He, que utiliza un programa de pulso sin eliminación de agua (ZG) a una temperatura de 300 K, con un pulso de excitación de 90 grados, tiempo de adquisición de 2,0 segundos y un retraso en relajación de 40 segundos. El número de escaneos se estableció en 8, no se utilizan los escaneos simulados.

[0202] La concentración de ácido málico [en g/l] se calcula basándose en las siguientes señales (δ en relación a ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico):

Ácido málico: primer dd de señales de ácido málico a 2,92 ppm n=1H (señal de ácido málico $\alpha-CH_2$ es un ddd, 2,89 ppm, 2H J= 4Hz, J=17Hz, J= 44Hz)

[0203] La concentración de ácido succínico [en g/L] se calcula basándose en las siguientes señales (δ en relación a ácido 4,4-dimetil-silapentano-1-sulfónico):

Ácido succínico: señal de ácido succínico a 2,67 ppm (s, 4 H)

La señal utilizada para el estándar: pico de ácido maleico en torno a 6,3 ppm (S, 2 H). La cuantificación mediante RMN se describe en Bharti et al., 2012, TrAC Trends in Analytical Chemistry 35:5-26.

[0204] El rendimiento del proceso de fermentación (g de ácido succínico / g de glucosa) se calcula dividiendo la cantidad de ácido succínico producido por la cantidad total de azúcares consumidos que se incluyen durante la fase de propagación de biomasa.

[0205] La cepa SUP-005 que contiene la triple eliminación de *nde1*, *nde2*, *gut2* muestra un aumento de 2 % en el rendimiento de proceso de fermentación de ácido succínico en comparación con SUC-947, tal como se determina en fermentaciones fed-batch controladas. Se demuestra que una combinación de eliminaciones en genes que codifican una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial (por ejemplo, *nde1* y / o *nde2*) y una glicerol- 3-fosfato deshidrogenasa (por ejemplo, *gut2*) tiene un efecto beneficioso sobre el rendimiento de proceso de fermentación de ácido succínico en una célula huésped.

[0206] La cepa SUP-007 que contiene la quintuple eliminación de *nde1*, *nde2*, *gut2*, *gpd1* y *gpd2* muestra un aumento adicional en el rendimiento de proceso de fermentación de ácido succínico; que es un aumento de 6 % en comparación con SUC-947, tal como se determina en fermentaciones fed-batch controladas. El título de ácido succínico mostró un aumento de 6 % en comparación con SUC-947, tal como se determinó en fermentaciones fed-batch controladas. Se demuestra que una eliminación de un gen que codifica una enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica (por ejemplo, eliminación de *gpd1* y / o *gpd2*) tiene un efecto beneficioso sobre el título y el rendimiento de proceso de fermentación de ácido succínico en una célula huésped.

5

10

REIVINDICACIONES

1. Célula huésped de levadura, cuya célula huésped de levadura es una célula de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que es capaz de producir ácido succínico y que comprende
 - una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 40 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 40; y
 - una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una NADH deshidrogenasa externa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 41 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 41; y
 - una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 42 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 42; y
 - como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 57 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 57; y
 - como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de como mínimo una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 58 o que comprende una secuencia que tiene como mínimo un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 58; y
 en la que la célula huésped sobreexpresa una o más copias de un ácido nucleico que codifica una fumarasa heteróloga y una o más copias de un ácido nucleico que codifica una fumarato reductasa.
2. Célula huésped de levadura, de acuerdo con la reivindicación anterior, en la que la célula huésped comprende adicionalmente como mínimo una modificación genética en su genoma que da lugar a la deficiencia de:
 - como mínimo una alcohol deshidrogenasa; o
 - como mínimo una aldehído deshidrogenasa; o una combinación de las mismas.
3. Célula huésped de levadura de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, que comprende una vía TCA reductora.
4. Célula huésped de levadura de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende enzimas seleccionadas entre el grupo de enzimas que catalizan las reacciones de:
 - piruvato a oxalacetato y/o fosfoenolpiruvato a oxalacetato;
 - oxalacetato a malato;
 - malato a fumarato; y
 - fumarato a succinato.
5. Célula huésped de levadura de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un transportador de ácido dicarboxílico que exporta el ácido succínico desde la parte interior de la célula al entorno extracelular.
6. Célula huésped de levadura de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula huésped comprende una o más copias de ácido nucleico que codifica una o más de una fosfoenolpiruvato carboxinasa, una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una piruvato carboxilasa, una malato deshidrogenasa y/o un transportador de ácido dicarboxílico.
7. Procedimiento de producción de ácido succínico, cuyo procedimiento comprende la fermentación de la célula huésped de levadura, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, en un medio de fermentación adecuado y la producción del ácido succínico.
8. Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende adicionalmente la recuperación del ácido succínico del medio de fermentación.
9. Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende adicionalmente la conversión del ácido succínico recuperado en un producto deseado, tal como un agente descongelante, un aditivo alimentario, un aditivo cosmético, un tensioactivo o un polímero, por ejemplo, un ácido succínico de polibutileno.

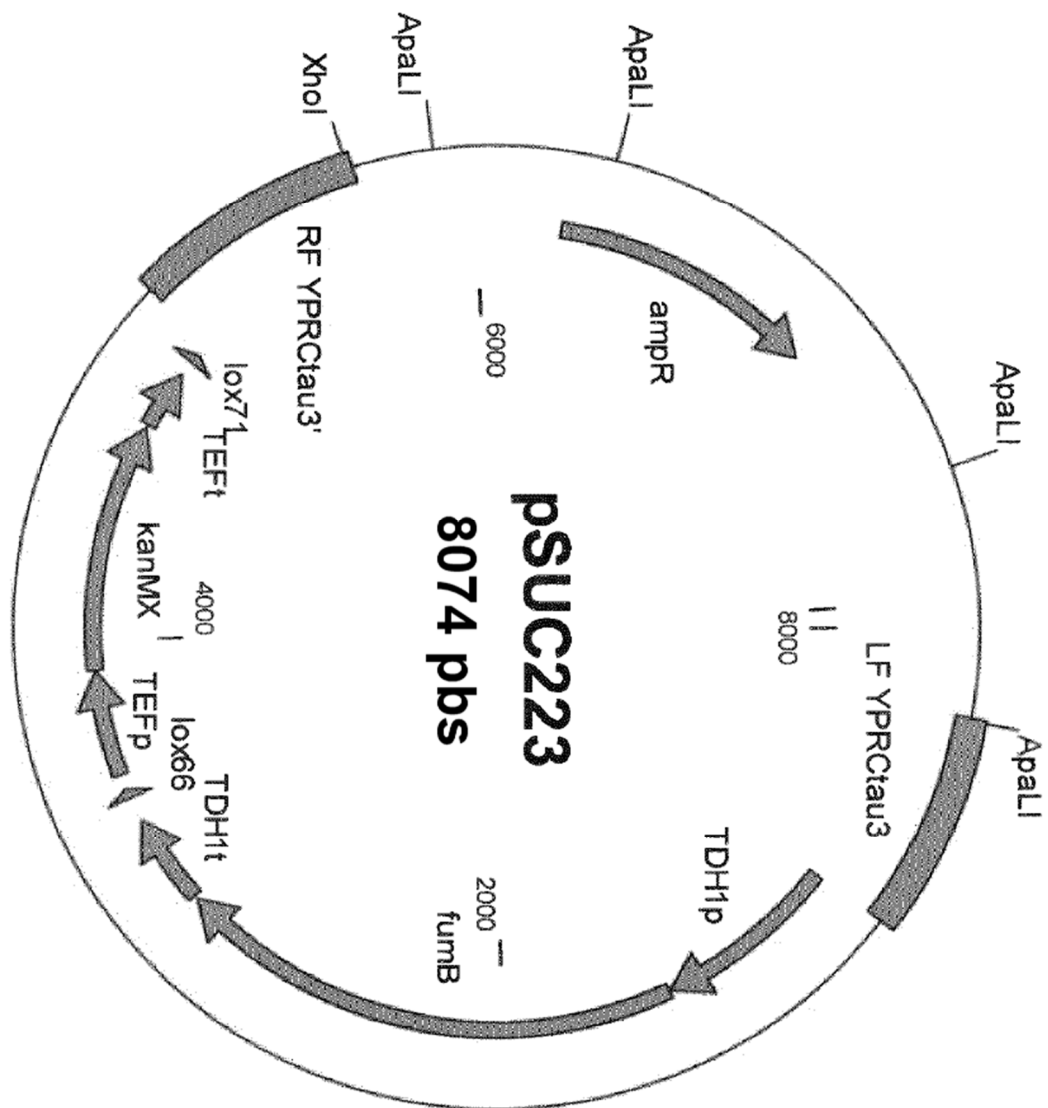


Fig. 1

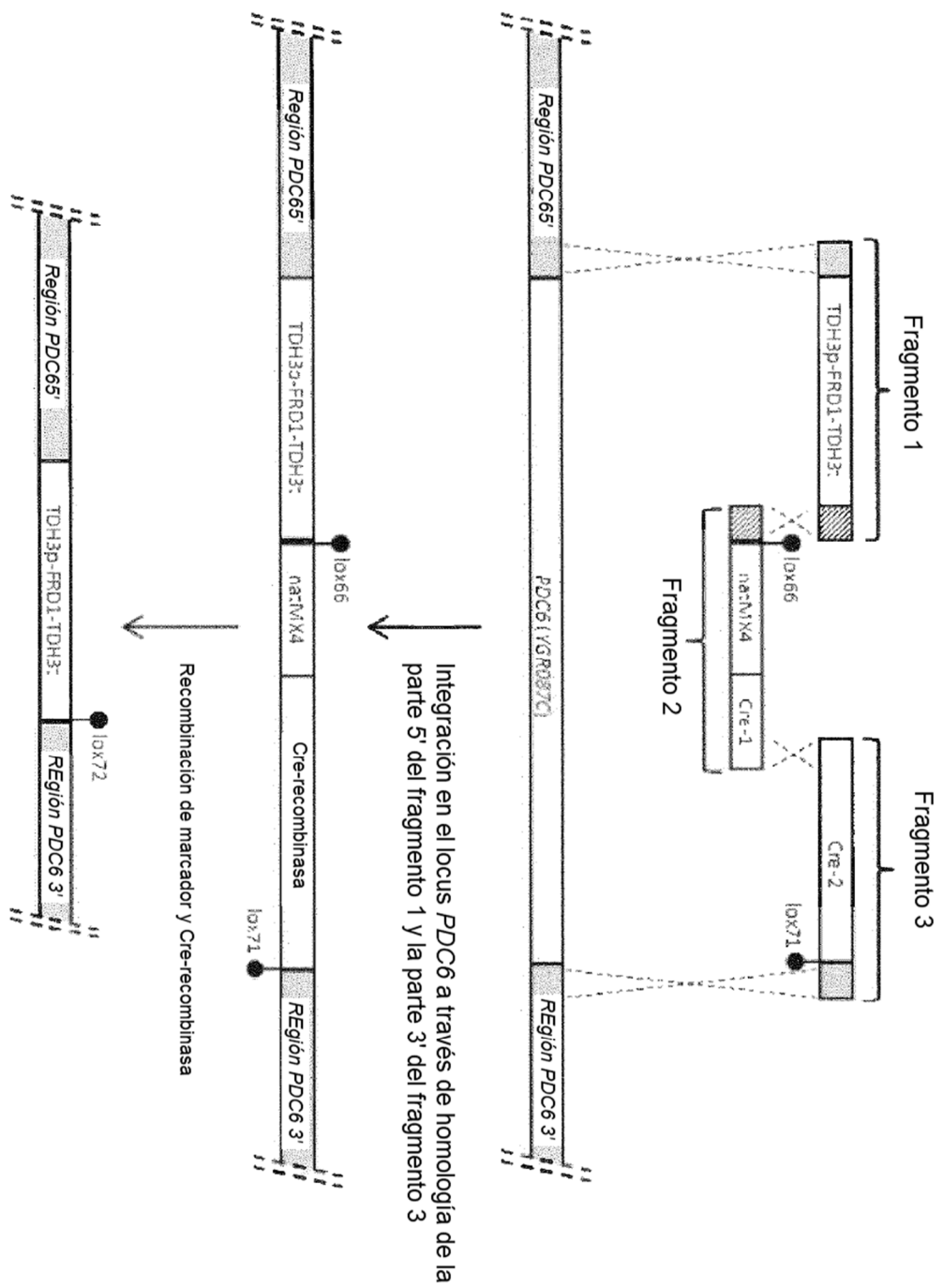


Fig. 2

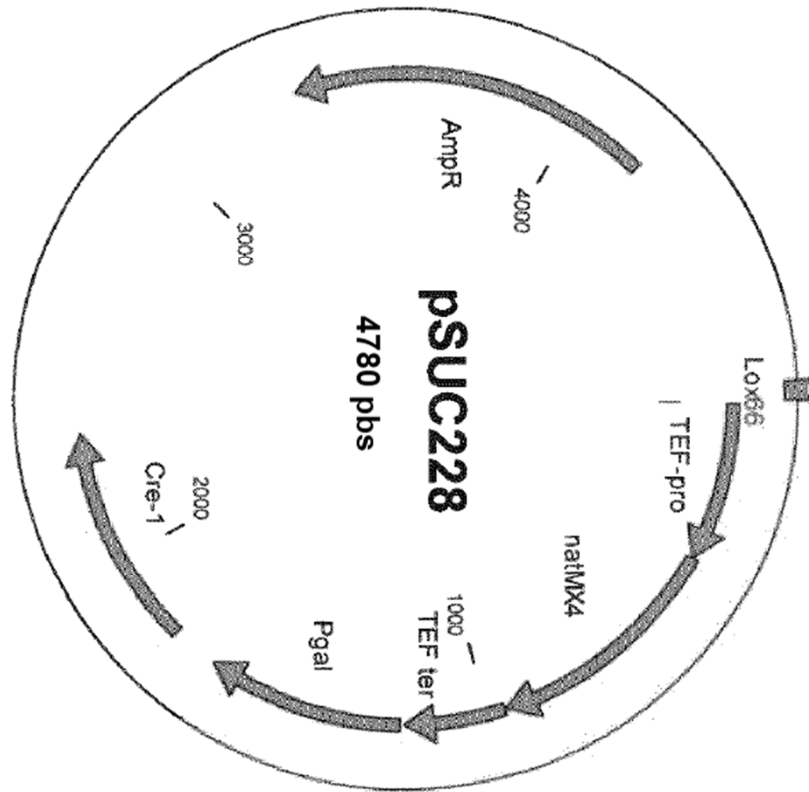


Fig. 3

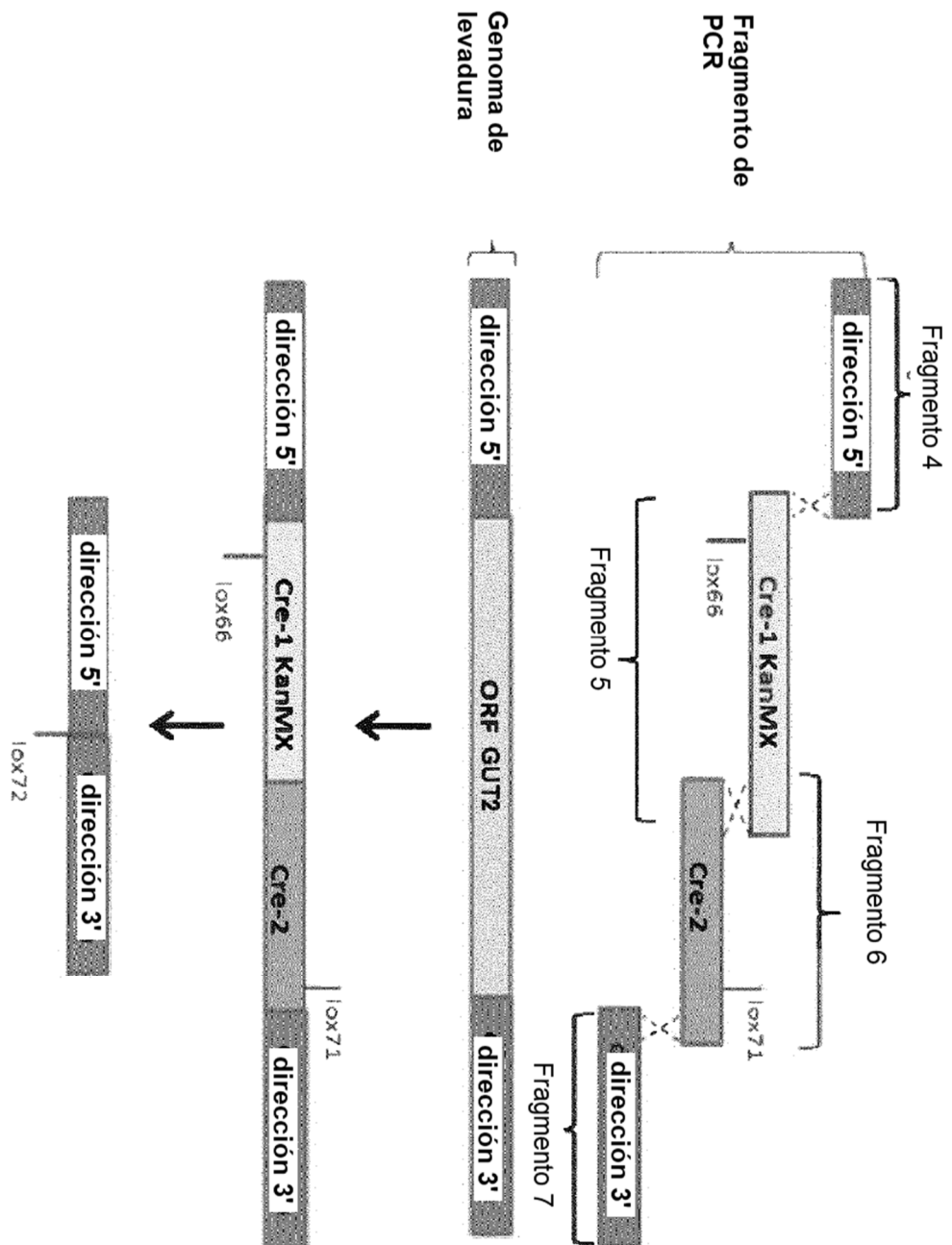


Fig. 4

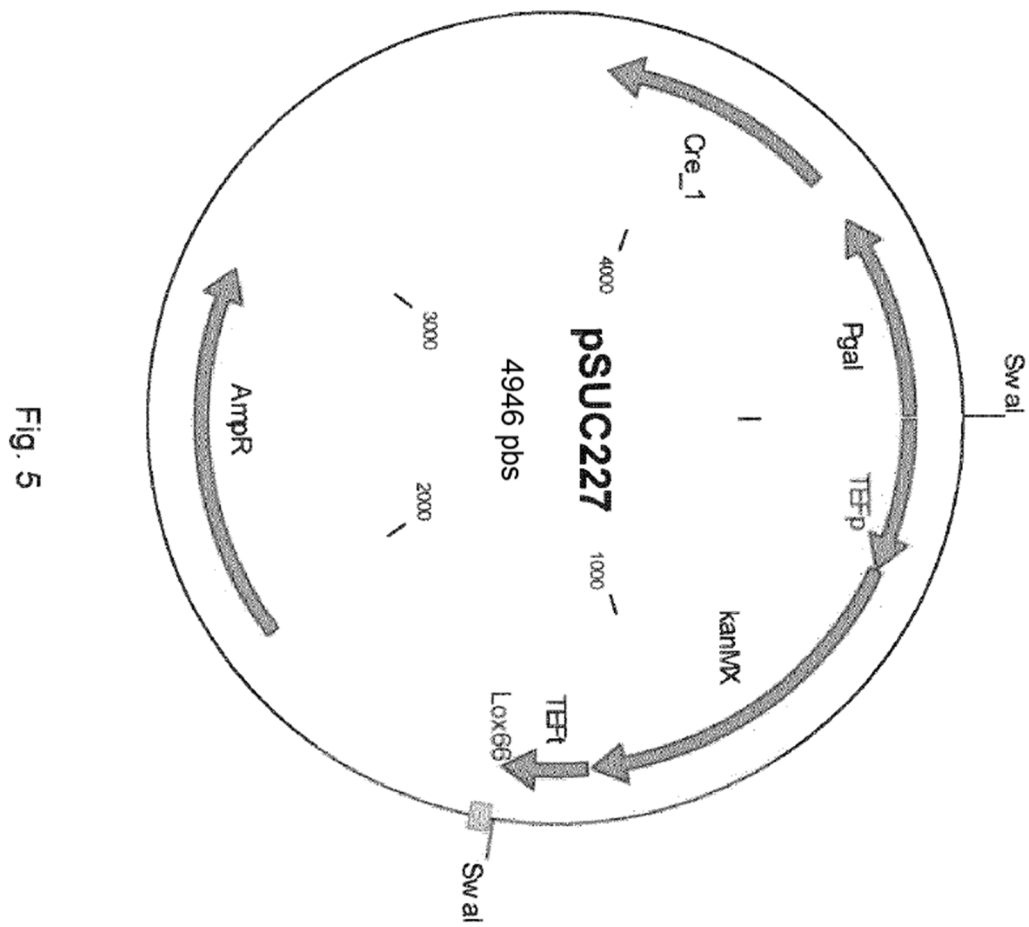


Fig. 5

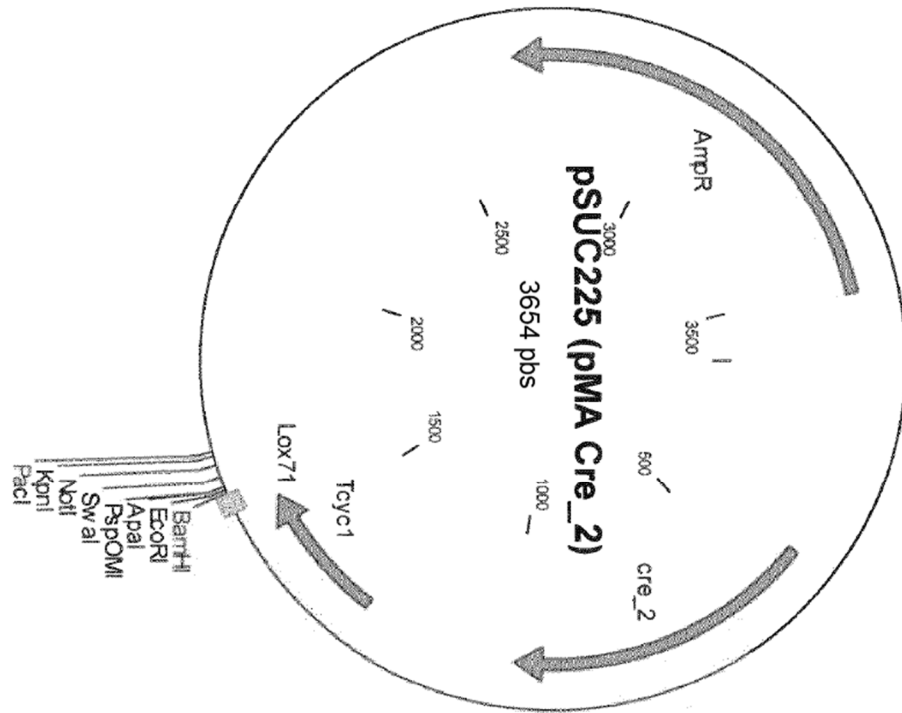


Fig. 6

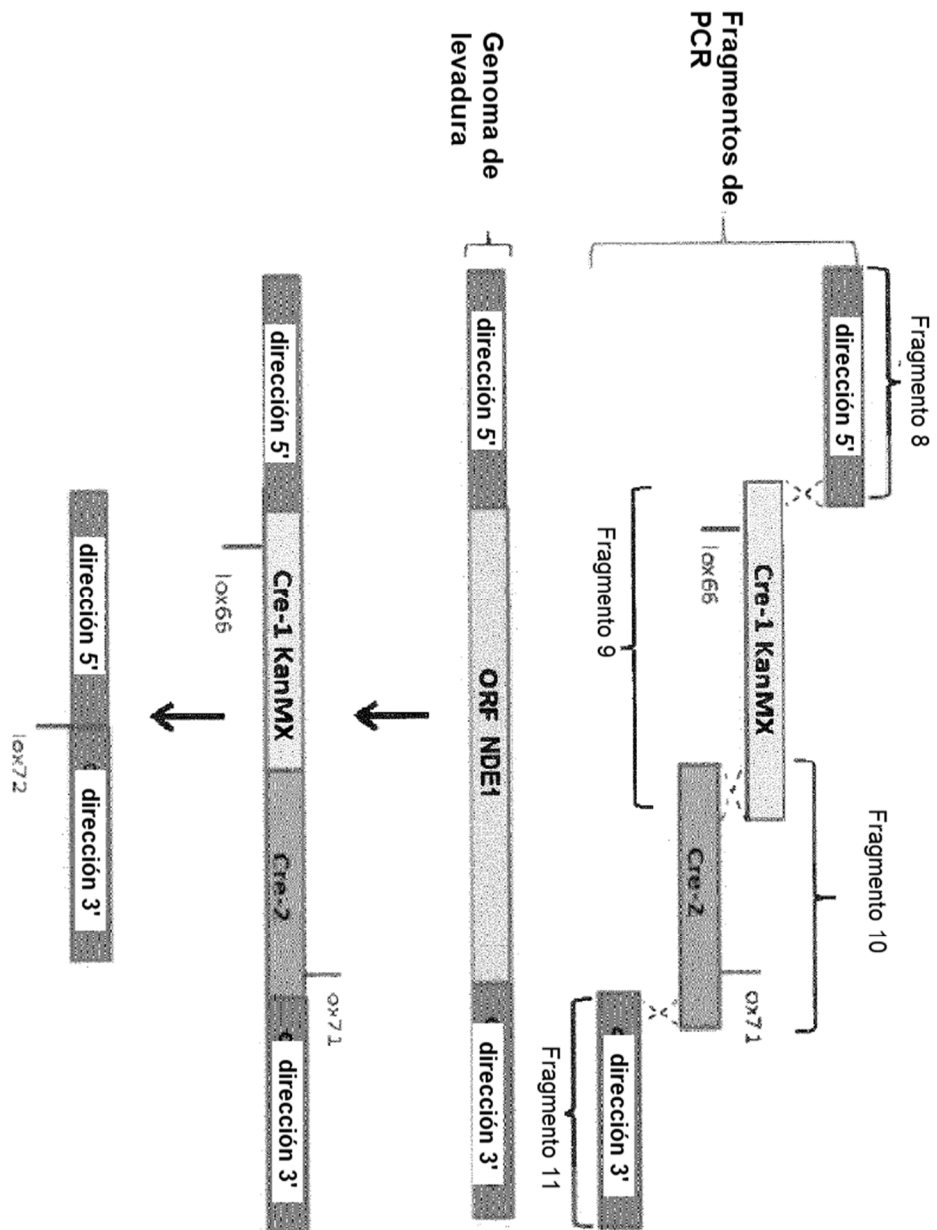


Fig. 7

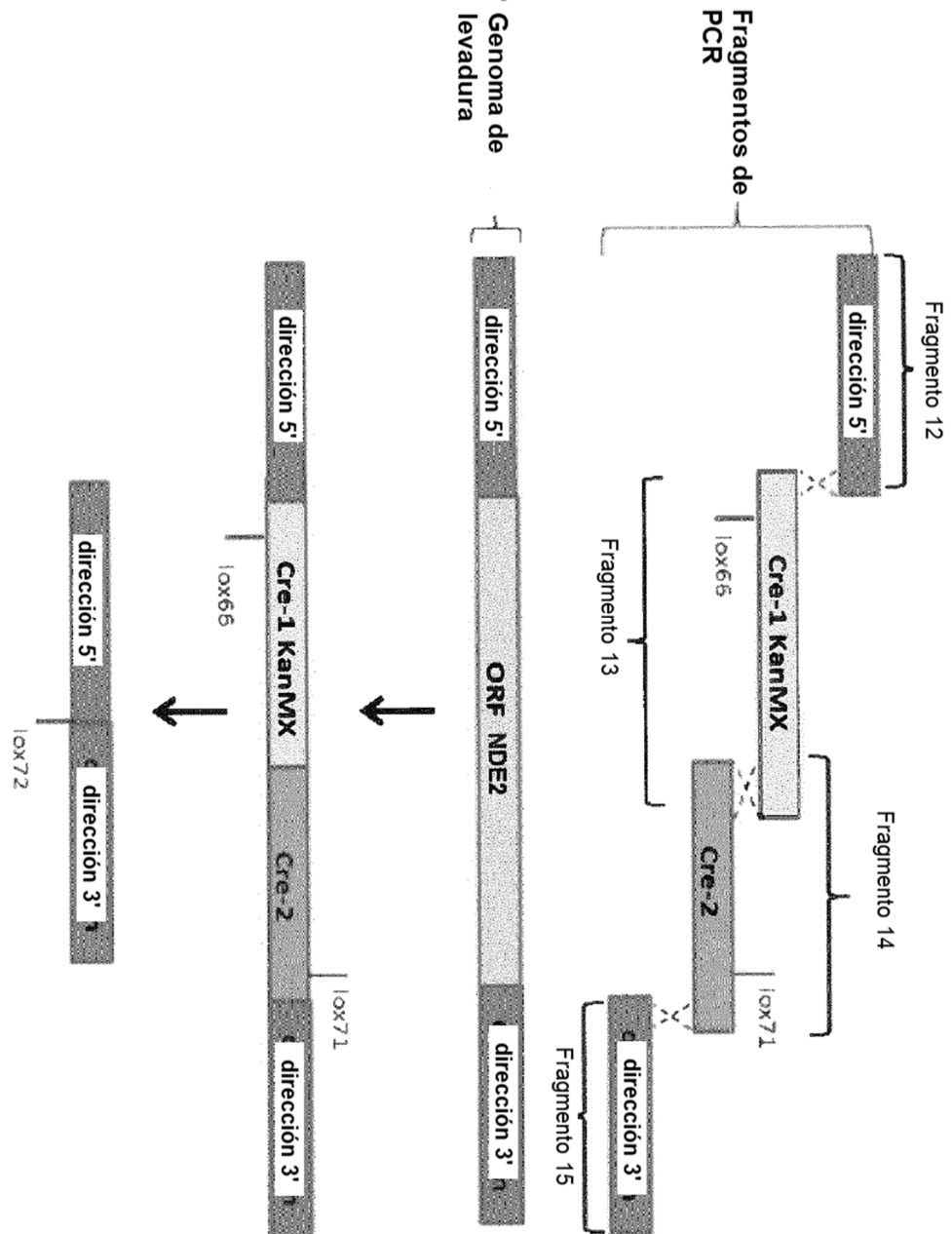


Fig. 8

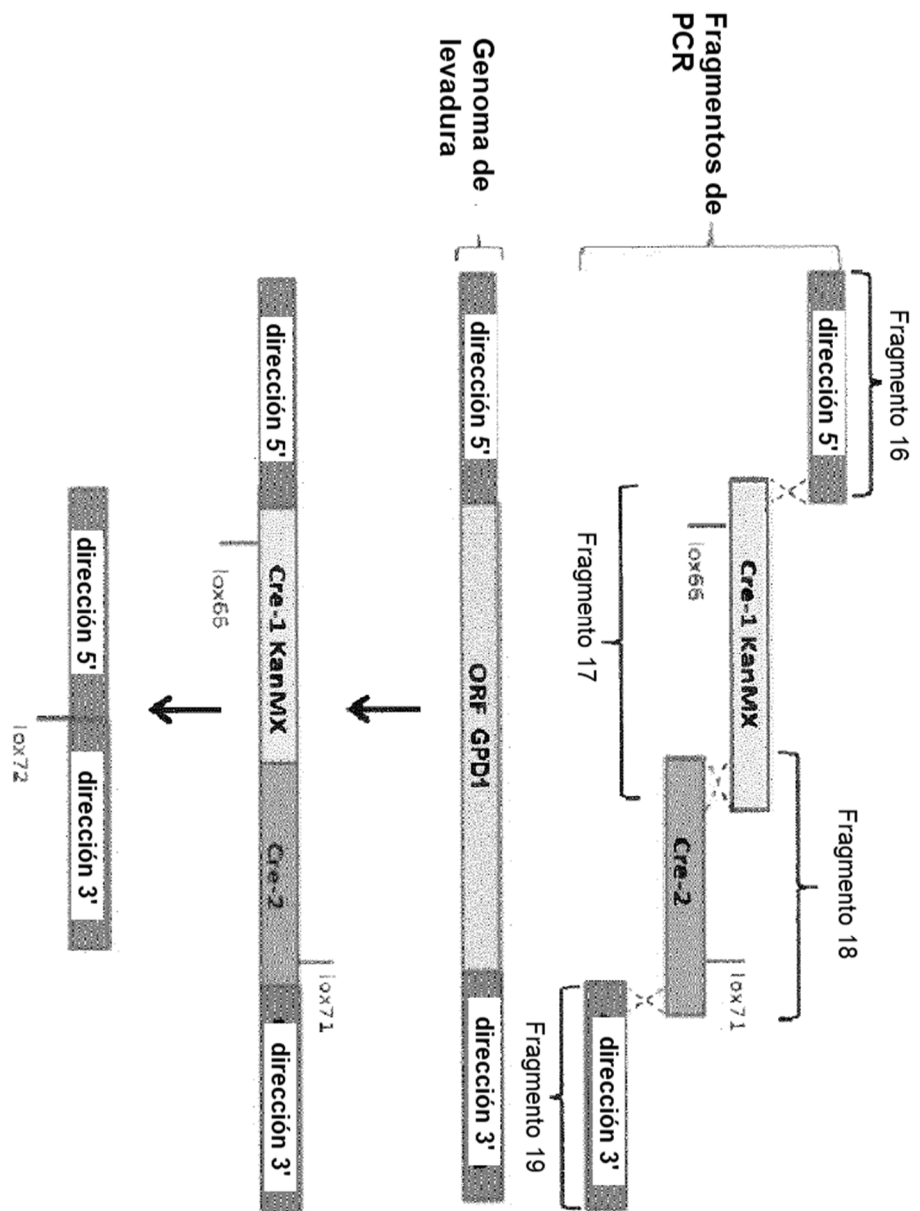


Fig. 9

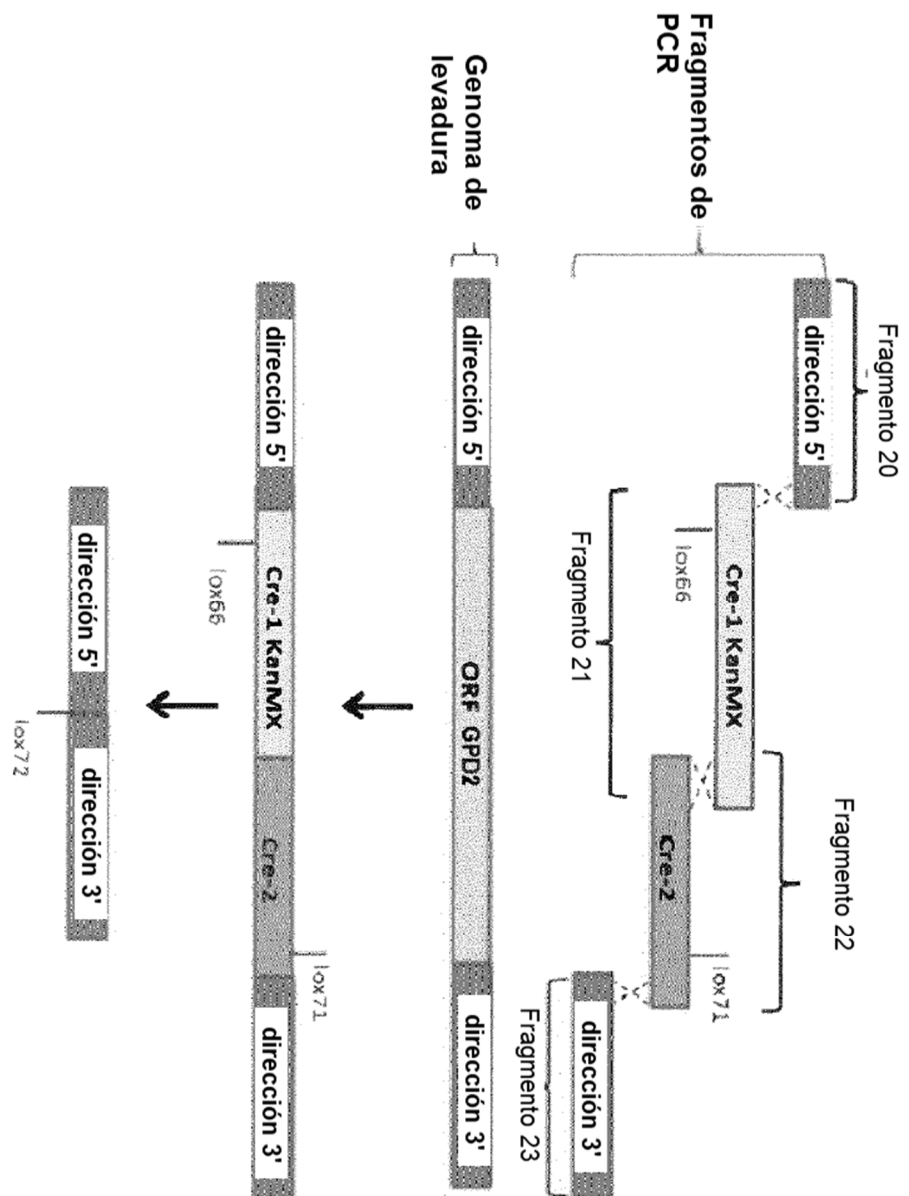


Fig. 10