(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 527 402**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2008** **E 12171986 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2570481**

(54) Título: **Materiales y métodos para la producción eficaz de succinato y malato**

(30) Prioridad:

20.03.2007 US 895806 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2015

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. (100.0%)
223 Grinter Hall
Gainesville, FL 32611, US

(72) Inventor/es:

JANTAMA, KAEMWICH;
HAUPT, MARK JOHN;
ZHANG, XUELI;
MOORE, JONATHAN C.;
SHANMUGAM, KEELNATHAM T. y
INGRAM, LONNIE O'NEAL

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 527 402 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

Materiales y métodos para la producción eficaz de succinato y malato

Antecedentes de la invención

La producción fermentativa de succinato a partir de materias primas renovables será cada vez más competitiva conforme aumenten los precios del petróleo. El succinato puede servir como un sustrato para su transformación en plásticos, disolventes y otros productos químicos actualmente hechos del petróleo (Lee *et al.,* 2004; Lee *et al.,* 2005; McKinlay *et al.,* 2007; Wendisch *et al.,* 2006; Zeikus *et al.,* 1999). Se han descrito muchas bacterias con la capacidad natural de producir succinato como un producto de fermentación principal (patente de EE. UU. Núm. 5.723.322; Tabla 1). Sin embargo, frecuentemente se requieren procesos complejos, medios complejos y tiempos de incubación largos.

Anteriormente se ha utilizado una variedad de enfoques genéticos para modificar genéticamente cepas de *Escherichia coli* para la producción de succinato con grados variables de éxito (Tabla 1). En la mayoría de los estudios, los títulos alcanzados fueron bajos, y fueron necesarios ingredientes de medio complejos tales como extracto de levadura o licor de maceración de maíz. La cepa NZN111 produjo succinato 108 mM con un rendimiento molar de 0,98 moles de succinato por mol de glucosa metabolizada (Chatterjee *et al.,* 2001; Millard *et al.,* 1996; Stols y Donnelly, 1997). Esta cepa fue manipulada genéticamente desactivando dos genes (*pflB*, que codifica piruvato formiato liasa, y *ldhA* que codifica lactato deshidrogenasa), y expresando en exceso dos genes de *E. coli*, malato deshidrogenasa (*mdh*) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), de plásmidos multicopia. La cepa HL27659k fue manipulada genéticamente mutando los genes de succinato deshidrogenasa (*sdhAB*), fosfato acetiltransferasa (*pta*), acetato cinasa (*ackA*), piruvato oxidasa (*poxB*), transportador de glucosa (*ptsG*), y el represor de isocitrato liasa (*iclR*). Esta cepa produjo succinato menor de 100 mM y requirió condiciones de fermentación de oxígeno limitado (Cox *et al.,* 2006; Lin *et al.,* 2005a, 2005b, 2005c; Yun *et al.,* 2005). El análisis del metabolismo *in silico* se ha usado para diseñar genes desactivados para crear una ruta en *E. coli* análoga a la ruta de succinato nativa en *Mannheimia succiniciproducens* (Lee *et al.,* 2005 y 2006). Sin embargo, la cepa resultante produjo muy poco succinato. Andersson et al. (2007) informaron sobre los valores más altos de producción de succinato (339 mM) por una *E. coli* manipulada genéticamente que contenía solo genes nativos.

Otros investigadores han buscado enfoques alternativos para expresar genes heterólogos en *E. coli*. La piruvato carboxilasa (*pyc*) de *Rhizobium eteloti* fue expresada en exceso a partir de un plásmido multicopia para dirigir el flujo de carbono a succinato (Gokarn *et al.,* 2000; Vemuri *et al.,* 2002a, 2002b). La cepa SBS550MG se construyó desactivando el represor de isocitrato liasa (*iclR*), *adhE, ldhA*, y *ackA*, y expresando en exceso *citZ* (citrato sintasa) de *Bacillus subtilis* y *pyc* de *R. etli* de un plásmido multicopia (Sánchez *et al.,* 2005a). Con esta cepa se produjo succinato 160 mM a partir de glucosa, con un rendimiento molar de 1,6.

También se han investigado procesos más complejos para la producción de succinato (Tabla 1). Muchos de estos procesos incluyen una fase de crecimiento aeróbico seguida por una fase de producción anaeróbica. En la fase anaeróbica se suministra frecuentemente dióxido de carbono, hidrógeno, o ambos (Andersson *et al.,* 2007; Sánchez *et al.,* 2005a y 2005b; Sánchez *et al.,* 2006; patente de los Estados Unidos Núm. 5.869.301; Vemuri *et al.,* 2002a y 2002b). En un estudio reciente con un productor de succinato nativo, *A. succiniciproducens*, se combinaron electrodiálisis, rociado con CO_2, reciclado celular, y alimentación por lotes (Meynial-Salles *et al.,* 2007).

La presente invención proporciona varias formas de microorganismos, tales como cepas de *E. coli*, que producen succinato con títulos y rendimientos altos, en medios de sales minerales, durante fermentaciones simples por lote de pH controlado, sin la necesidad de genes heterólogos ni plásmidos. Durante el desarrollo, se caracterizó una cepa intermedia que produjo malato como producto dominante.

Breve resumen de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre en las reivindicaciones es proporcionada solamente como información.

La presente invención se refiere a microorganismos novedosos útiles en la producción de ácido láctico, por ejemplo *Escherichia coli*. Por consiguiente, los materiales y métodos de la presente invención se pueden usar para producir succinato y malato para usarse en una variedad de aplicaciones.

En algunos aspectos de la descripción, se pueden usar derivados de *Escherichia coli* (también referida aquí como *E. coli*) para la construcción de cepas que producen succinato, malato y alanina. En varios aspectos se puede usar *E. coli* C (por ejemplo, ATCC 8739), como se puede usar cualquier otra cepa de *E. coli* que se pueda obtener de diversos depósitos o fuentes comerciales. También, en algunos aspectos, los microbios de la descripción modificados genéticamente contienen solo genes nativos (esto es, no contienen material genético de otros organismos). De la siguiente descripción se harán muy evidentes ventajas adicionales de esta exposición.

Breve descripción de las figuras

Figuras 1A-1B. Fermentación de glucosa a succinato. La Figura 1A muestra la ruta estándar de fermentación de glucosa en *E. coli*. Esta ruta ha sido modificada de Unden y Kleefeld (2004). Las flechas en negrita representan las rutas fermentativas centrales. Las cruces representan las supresiones de genes realizadas en este estudio para construir KJ012 (*ldhA, adhE, ackA*). Genes y enzimas: *ldhA*, lactato deshidrogenasa; *pflB*, piruvato-formiato liasa; *focA*, transportador de formiato; *pta*, fosfato acetil transferasa; *ackA*, acetato cinasa; *adhE*, alcohol deshidrogenasa; *ppc*, fosfoenolpiruvato carboxilasa; *pdh*, complejo de piruvato deshidrogenasa; *gltA*, citrato sintasa; *mdh*, malato deshidrogenasa; *fumA, fumB, y fumC*, isoenzimas fumarasas; *frdABCD*, fumarato reductasa; *fdh*, formiato deshidrogenasa; *icd*, isocitrato deshidrogenasa; *acs*, acetil~CoA sintetasa; *mgsA*, metilglioxal sintasa; *poxB*, piruvato oxidasa; *aldA*, aldehído deshidrogenasa; y *aldB*, aldehído deshidrogenasa. La Figura 1B muestra el acoplamiento de la producción de ATP y el crecimiento con la producción de succinato y malato en cepas de *E. coli* modificadas genéticamente. Las flechas continuas conectan las reservas de NADH. Las flechas de puntos conectan las reservas de NAD^+. Durante la glicólisis bajo condiciones anaeróbicas, el crecimiento está acoplado obligadamente con la producción de ATP y la oxidación de NADH.

Figuras 2A-2D. Rutas potenciales de carboxilación para la producción de succinato en *E. coli*. Los genes que codifican las enzimas clave de carboxilación se muestran en letra negrita. La Figura 2A muestra la PEP carboxilasa. No se produce ATP de fosfoenolpiruvato (PEP). Esta es considerada como la ruta principal para la producción de succinato en *E. coli* durante la fermentación de glucosa.

La Figura 2B muestra la enzima málica (NADH). La energía se conserva durante la producción de ATP a partir de ADP y PEP por medio de piruvato cinasa (*pykA o pykF*). La enzima málica (*sfcA*) cataliza una carboxilación reductiva conectada con NADH para producir malato. La Figura 2C muestra la enzima málica (NADPH). La energía se conserva durante la producción de ATP a partir de ADP y PEP por medio de piruvato cinasa (*pykA o pykF*). La enzima málica (*maeB*) cataliza una carboxilación reductiva conectada con NADPH para producir malato. La Figura 2D muestra la PEP carboxi cinasa. La energía se conserva por la producción de ATP durante la carboxilación de PEP para producir ácido oxaloacético.

Figuras 3A-3C. Crecimiento durante la evolución metabólica de KJ012 para producir KJ017, KJ032, y KJ060. La cepa KJ012 se transfirió secuencialmente en medio NBS que contenía 5% de glucosa (p/v) (Figura 3A) y 10% de glucosa (p/v) (Figura 3B), respectivamente, para producir KJ017. Después de la supresión de *focA y pflB*, la cepa resultante (KJ032) se sub-cultivó inicialmente en medio con un suplemento de acetato (Figura 3C). Los niveles de acetato disminuyeron y subsiguientemente se eliminaron durante transferencias adicionales para producir KJ060. La línea quebrada representa la fermentación por KJ017 sin añadir acetato, como comparación. Símbolos: densidad óptica a DO_{550nm}, •.

Figuras 4A-4F. Resumen de productos de fermentación durante la evolución metabólica de cepas para la producción de succinato y malato. A los cultivos se les añadió un suplemento de acetato de sodio como se indica. Las flechas negras representan la transición entre las condiciones de fermentación como lo indica el texto. No se detectó formiato y solo se detectaron pequeñas cantidades de lactato durante la evolución metabólica de KJ032. No se detectaron formiato ni lactato durante la evolución metabólica de KJ070 y KJ072. Figura 4A (5% de glucosa, p/v) y Figura 4B (10% de glucosa, p/v), KJ012 a KJ017; Figura 4C (5% de glucosa, p/v) y Figura 4D (10% de glucosa, p/v), KJ032 a KJ060; Figura 4E, 10% de glucosa, KJ070 a KJ071; Figura 4F, 10% de glucosa, KJ072 a KJ073. Símbolos para todos: ■, succinato; □, formiato; Δ, acetato; ▲, malato; ♦, lactato; y ▼ piruvato.

Figura 5. Diagrama que resume los pasos de la modificación genética y la evolución metabólica de *E. coli* C como biocatalizador para la producción de succinato y malato. Este proceso representa 261 transferencias seriadas que proveen más de 2000 generaciones de selección basada en crecimiento. Los clones se aislaron del cultivo final de cada régimen y se les dieron designaciones de cepa, mostradas entre paréntesis en la Tabla 3.

Figura 6. Fermentación de glucosa y rutas asociadas. Metabolismo central que indica los genes suprimidos en los constructos modificados genéticamente para la producción de succinato. Las flechas continuas representan rutas fermentativas centrales. La flecha de trazos representa la ruta microaerófila para la oxidación de piruvato a acetato (*poxB*). Las flechas de puntos muestran rutas que funcionan normalmente durante el metabolismo aeróbico, piruvato deshidrogenasa (*pdh*) y la derivación de glioxilato (*aceAB*). Las cruces dentro de los cuadros representan las tres supresiones iniciales de genes (*ldhA, adhE, ackA*) que se usaron para construir KJ012 y KJ017. Las cruces simples marcan genes de adición que fueron suprimidos durante la construcción de derivados de KJ017: KJ032 (*ldhA, adhE, ackA, focA, pflB*), y KJ070 (*ldhA, adhE, ackA, focA, pflB, mgsA*), y KJ072 (*ldhA, adhE, ackA, focA, pflB, mgsA, poxB*). Genes y enzimas: *ldhA*, lactato deshidrogenasa; *focA*, transportador de formiato; *pflB*, piruvato-formiato liasa; *pta*, fosfato acetil transferasa; *ackA*, acetato cinasa; *adhE*, alcohol deshidrogenasa; *ppc*, fosfoenolpiruvato carboxilasa; *pdh*, complejo de piruvato deshidrogenasa; *gltA*, citrato sintasa; *mdh*, malato deshidrogenasa; *fumA, fumB, y fumC*, isoenzimas fumarasas; *frdABCD*, fumarato reductasa; *fdh*, formiato deshidrogenasa; *mgsA*, metilglioxal sintasa; *gloAB*, glioxilasa I y II; *poxB*, piruvato oxidasa; *aceA*, isocitrato liasa; *aceB*, malato sintasa; *acnAB*, aconitasa; y *acs*, acetil~CoA sintetasa.

Figuras 7A-7C. Producción de succinato y malato en medios de sales minerales (10% de glucosa) por derivados de *E. coli* C. La Figura 7A muestra la producción de succinato por KJ060 en medio AM1. La Figura 7B muestra la producción de succinato por KJ073 en medio AM1. La Figura 7C muestra la producción de malato por KJ071 en

medio NBS. Las fermentaciones se inocularon en una cantidad de 33 mg de peso seco celular·l^{-1}. Símbolos para todos: o, glucosa; •, succinato; ■, malato; Δ, masa celular.

Figura 8. Construcción de pLOI4162. Las flechas continuas cortas asociadas con pEL04 y pLOI4152 representan cebadores usados para la amplificación de ADN.

Figura 9. Ruta de producción de succinato en KJ073. El gen *pck* que codifica fosfoenolpiruvato carboxi cinasa, la principal enzima de carboxilación implicada en la producción de succinato en este estudio, se muestra en el tipo inverso. Las flechas continuas indican reacciones que se espera sean funcionales durante la fermentación anaeróbica de la glucosa. Las cruces continuas indican genes suprimidos. Las cruces dentro de los cuadros representan supresiones clave usadas para construir la cepa inicial para la producción de succinato, KJ017 (*IdhA, adhE, ackA*). La línea de trazos representa la oxidación de piruvato a acetato por PoxB, un proceso que típicamente es funcional solo bajo condiciones microaerófilas. Las líneas de puntos indican reacciones que están asociadas principalmente con el metabolismo aeróbico. Genes y enzimas: *IdhA*, lactato deshidrogenasa; *pflB*, piruvato-formiato liasa; *focA*, transportador de formiato; *pta*, fosfato acetil transferasa; *ackA*, acetato cinasa; *adhE*, alcohol deshidrogenasa; *ppc*, fosfoenolpiruvato carboxilasa; *pdh*, complejo de piruvato deshidrogenasa; *gltA*, citrato sintasa; *mdh*, malato deshidrogenasa; *fumA, fumB, y fumC*, isoenzimas fumarasas; *frdABCD*, fumarato reductasa; *fdh*, formiato deshidrogenasa; *icd*, isocitrato deshidrogenasa; *acs*, acetil~CoA sintetasa; *mgsA*, metilglioxal sintasa; *poxB*, piruvato oxidasa; *aldA*, aldehído deshidrogenasa; y *aldB*, aldehído deshidrogenasa. El gen *tdcE* (piruvato-formiato liasa, homólogo a *pfl*B) y el gen *tcdD* (propionato cinasa, homólogo a *ackA*), se muestran entre paréntesis y son expresados típicamente durante la degradación de treonina.

Figura 10. Porción expandida de metabolismo que ilustra las rutas de genes adicionales que se han suprimido (cruces continuas). El succinato y el acetato son los productos principales (en cuadros) de las fermentaciones de KJ073. Genes y enzimas: *citDEF*, citrato liasa; *gltA*, citrato sintasa; *aspC*, aspartato aminotransferasa; *pck*, fosfoenolpiruvato carboxi cinasa; *sfcA*, enzima málica conectada con NAD^+; *fumA* y *fumB*, fumarasa; *frdABCD*, fumarato reductasa; *pykA* y *pykF*, piruvato cinasa; *tdcE*, piruvato-formiato liasa (homólogo de *pflB*); *pta*, fosfato transacetilasa; *tcdD*, acetato cinasa (homólogo de *ackA*).

Descripción detallada de la invención

La presente descripción provee materiales y métodos en donde se usan combinaciones únicas y ventajosas de mutaciones de genes para dirigir el flujo del carbono a un producto deseado, tal como succinato y/o malato. Las técnicas de la presente descripción se pueden usar para obtener productos a partir de rutas nativas y también de rutas recombinantes. Ventajosamente, la presente descripción provee una plataforma versátil para la producción de estos productos, solo con sales minerales y azúcar como nutrientes.

Un microorganismo de la presente descripción se puede obtener por modificación de uno o más genes objetivo en una bacteria, tal como las que pertenecen a *Escherichia*. En algunas realizaciones, la bacteria que se modifica puede ser *Escherichia coli*, o una cepa particular de la misma, tal como *E. coli* B*, E. coli* C*, E. coli* W, o similar. En algunas otras realizaciones de la invención, las bacterias que se pueden modificar de acuerdo con la presente invención, incluyen, sin limitación, *Gluconobacter oxydans, Gluconobacter asaii, Achromobacter delmarvae, Achromobacter viscosus, Achromobacter lacticum, Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium radiobacter, Alcaligenes faecalis, Arthrobacter citreus, Arthrobacter tumescens, Arthrobacter paraffineus, Arthrobacter hydrocarboglutamicus, Arthrobacter oxydans, Aureobacterium saperdae, Azotobacter indicus, Brevibacterium ammoniagenes, divaricatum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium flavum, Brevibacterium globosum, Brevibacterium fuscum, Brevibacterium ketoglutamicum, Brevibacterium helcolum, Brevibacterium pusillum, Brevibacterium testaceum, Brevibacterium roseum, Brevibacterium immariophilium, Brevibacterium linens, Brevibacterium protopharmiae, Corynebacterium acetophilum, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium callunae, Corynebacterium acetoacidophilum, Corynebacterium acetoglutamicum, Enterobacter aerogenes, Erwinia amylovora, Erwinia carotovora, Erwinia herbicola, Erwinia chrysanthemi, Flavobacterium peregrinum, Flavobacterium fucatum, Flavobacterium aurantinum, Flavobacterium rhenanum, Flavobacterium sewanense, Flavobacterium breve, Flavobacterium meningosepticum, Micrococcus sp. CCM825, Morganella morganii, Nocardia opaca, Nocardia rugosa, Planococcus eucinatus, Proteus rettgeri, Propionibacterium shermanii, Pseudomonas synxantha, Pseudomonas azotoformans, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas ovalis, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas acidovolans, Pseudomonas mucidolens, Pseudomonas testosteroni, Pseudomonas aeruginosa, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous, Rhodococcus sp.* ATCC 15592*, Rhodococcus sp.* ATCC 19070*, Sporosarcina ureae, Staphylococcus aureus, Vibrio metschnikovii, Vibrio tyrogenes, Actinomadura madurae, Actinomyces violaceochromogenes, Kitasatosporia parulosa, Streptomyces coelicolor, Streptomyces flavelus, Streptomyces griseolus, Streptomyces lividans, Streptomyces olivaceus, Streptomyces tanashiensis, Streptomyces virginiae, Streptomyces antibioticus, Streptomyces cacaoi, Streptomyces lavendulae, Streptomyces viridochromogenes, Aeromonas salmonicida, Bacillus pumilus, Bacillus circulans, Bacillus thiaminolyticus, Escherichia freundii, Microbacterium ammoniaphilum, Serratia marcescens, Salmonella typhimurium, Salmonella schottmulleri, Xanthomonas citri*, etcétera.

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona cepas bacterianas (tales como *E. coli*) que carecen de plásmidos, genes de resistencia a antibióticos, y/o material de otros organismos que son adecuados para la

producción de succinato o malato. A diferencia de otros sistemas microbianos, los microorganismos de la presente descripción se pueden usar en un proceso de producción de un solo paso usando azúcares como sustratos, tienen velocidades altas de producción de producto, rendimientos altos, requerimientos nutricionales simples (por ejemplo medio de sales minerales), y un metabolismo robusto que permite la bioconversión de hexosas, pentosas, y muchos disacáridos.

De esta manera, los microorganismos producidos de acuerdo con la presente descripción pueden tener uno o más genes objetivo desactivados por varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los genes objetivo pueden ser desactivados introduciendo inserciones, supresiones o mutaciones aleatorias en el gen objetivo. De esta manera, algunos aspectos de la descripción proveen la inserción de al menos un codón de detención (por ejemplo de uno a diez codones de detención o más) en el gen objetivo. Algunos aspectos de la invención proveen la inserción o supresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 bases o más, para introducir una mutación de desplazamiento de marco en un gen objetivo. Otros aspectos de la descripción proveen la inserción o supresión de 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 28, o 29 bases o más, para introducir una mutación de desplazamiento de marco en un gen objetivo. Otros aspectos de la presente solicitud proveen la introducción de una o más mutaciones puntuales (por ejemplo, de 1 a 30 o más), dentro de un gen objetivo, mientras que otros aspectos de la invención proveen la supresión parcial, total o completa de un gen objetivo de los microorganismos de la descripción. En cada uno de estos aspectos de la descripción, las rutas metabólicas son desactivadas por anulación de la actividad enzimática del polipéptido codificado por el gen o los genes objetivo.

El “gen o los genes objetivo”, según se utiliza en la presente memoria, se refiere al gen que codifica acetato cinasa, alcohol deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa, citrato liasa, transportador de formiato, lactato deshidrogenasa, metilglioxal sintasa, piruvato-formiato liasa, piruvato oxidasa, fosfato acetiltransferasa, enzima málica, y/o propionato cinasa/α-cetobutirato-formiato liasa. En ciertos aspectos preferidos, los genes son *ackA* (acetato cinasa), *adhE* (alcohol deshidrogenasa), *aspC* (aspartato aminotransferasa), *citCDEF* (citrato liasa), *focA* (transportador de formiato), *ldhA* (lactato deshidrogenasa), *mgsA* (metilglioxal sintasa), *pflB* (piruvato-formiato liasa), *poxB* (piruvato oxidasa), *pta* (fosfato acetiltransferasa), *sfcA* (enzima málica) y/o *tdcDE* (propionato cinasa/α-cetobutirato-formiato liasa). De esta manera, en algunos aspectos de la descripción, uno o más de estos genes están desactivados en un microorganismo (cualquier cepa bacteriana que contenga dichos genes, por ejemplo *E. coli*). El proceso de selección de las cepas con mejoramiento del crecimiento y producción de succinato o malato, es referido como “evolución metabólica” (ejemplos de la cual se proveen en los ejemplos descritos). Se entiende que un “gen nativo de *E. coli*” o “genes nativos de *E. coli*”, son uno o más genes que se encuentran naturalmente en un microorganismo *E. coli,* a diferencia de un “gen heterólogo” que se introduce en *E. coli* y que se obtuvo de cualquier microorganismo diferente de *E. coli*.

Varios aspectos no limitantes de la presente descripción incluyen:

1. Una cepa bacteriana modificada genéticamente que comprende modificaciones genéticas en uno o más de los siguientes genes objetivo: a) acetato cinasa, b) lactato deshidrogenasa, c) alcohol deshidrogenasa, d) piruvato-formiato liasa, e) metilglioxal sintasa, f) piruvato oxidasa, y/o g) citrato liasa, anulando dichas modificaciones genéticas la actividad enzimática del polipéptido producido por dicho gen objetivo;

2. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con el aspecto 1, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es: *Escherichia coli*, *Gluconobacter oxydans, Gluconobacter asaii, Achromobacter delmarvae, Achromobacter viscosus, Achromobacter lacticum, Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium radiobacter, Alcaligenes faecalis, Arthrobacter citreus, Arthrobacter tumescens, Arthrobacter paraffineus, Arthrobacter hydrocarboglutamicus, Arthrobacter oxydans, Aureobacterium saperdae, Azotobacter indicus, Brevibacterium ammoniagenes, divaricatum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium flavum, Brevibacterium globosum, Brevibacterium fuscum, Brevibacterium ketoglutamicum, Brevibacterium helcolum, Brevibacterium pusillum, Brevibacterium testaceum, Brevibacterium roseum, Brevibacterium immariophilium, Brevibacterium linens, Brevibacterium protopharmiae, Corynebacterium acetophilum, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium callunae, Corynebacterium acetoacidophilum, Corynebacterium acetoglutamicum, Enterobacter aerogenes, Erwinia amylovora, Erwinia carotovora, Erwinia herbicola, Erwinia chrysanthemi, Flavobacterium peregrinum, Flavobacterium fucatum, Flavobacterium aurantinum, Flavobacterium rhenanum, Flavobacterium sewanense, Flavobacterium breve, Flavobacterium meningosepticum, Micrococcus sp.* CCM825*, Morganella morganii, Nocardia opaca, Nocardia rugosa, Planococcus eucinatus, Proteus rettgeri, Propionibacterium shermanii, Pseudomonas synxantha, Pseudomonas azotoformans, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas ovalis, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas acidovolans, Pseudomonas mucidolens, Pseudomonas testosteroni, Pseudomonas aeruginosa, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous, Rhodococcus sp.* ATCC 15592*, Rhodococcus sp.* ATCC 19070*, Sporosarcina ureae, Staphylococcus aureus, Vibrio metschnikovii, Vibrio tyrogenes, Actinomadura madurae, Actinomyces violaceochromogenes, Kitasatosporia parulosa, Streptomyces coelicolor, Streptomyces flavelus, Streptomyces griseolus, Streptomyces lividans, Streptomyces olivaceus, Streptomyces tanashiensis, Streptomyces virginiae, Streptomyces antibioticus, Streptomyces cacaoi, Streptomyces lavendulae, Streptomyces viridochromogenes, Aeromonas salmonicida, Bacillus pumilus, Bacillus circulans, Bacillus thiaminolyticus, Escherichia freundii, Microbacterium ammoniaphilum, Serratia marcescens, Salmonella typhimurium, Salmonella schottmulleri,* o *Xanthomonas citri*;

3. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con el aspecto 1 o 2, en donde dicha cepa bacteriana modificada es *E. coli* B;

4. La cepa bacteriana modificada genéticamente de los aspectos 1, 2 o 3, en donde los siguientes genes objetivo están desactivados: a) acetato cinasa, b) lactato deshidrogenasa, c) alcohol deshidrogenasa, d) piruvato-formiato liasa, y e) piruvato oxidasa;

5. La cepa bacteriana modificada genéticamente del aspecto 4, en donde dicha cepa bacteriana también comprende un gen de metilglioxal sintasa desactivado;

6. La cepa bacteriana modificada genéticamente de los aspectos 4 o 5, en donde dicha cepa bacteriana también comprende un gen de citrato liasa desactivado;

7. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con los aspectos 1, 2, 3, 4, o 5, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente está evolucionada metabólicamente;

8. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con los aspectos 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7, en donde los genes, o porciones de los mismos, están suprimidos;

9. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con los aspectos 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7, en donde los genes son desactivados con mutaciones de desplazamiento de marco, mutaciones puntuales, la inserción de codones de detención, o combinaciones de los mismos;

10. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con los aspectos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es una cepa de *E. coli* y no contiene un gen exógeno o fragmento del mismo (o contiene solo genes nativos de *E. coli*);

11. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con los aspectos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, con la condición de que: 1) dicha cepa bacteriana modificada genéticamente no debe tener uno o más de los siguientes genes desactivados: a) fumarato reductasa b) ATP sintasa; c) 2-cetoglutarato deshidrogenasa (*sucAB*); d) succinato deshidrogenasa (por ejemplo, *sdhAB*), fosfato acetiltransferasa (por ejemplo, *pta*); e) transportador de glucosa (por ejemplo, *ptsG*); f) represor de isocitrato liasa (por ejemplo, *iclR*); y/o 2) que dicha cepa modificada genéticamente no contenga un plásmido o un plásmido multicopia que codifique y/o exprese en exceso genes tales como malato deshidrogenasa (*mdh*) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), piruvato carboxilasa (*pyc*) y/o citrato sintasa (por ejemplo, *Bacillus subtilis citZ*);

12. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con los aspectos 1-11, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es KJ012, KJ017, KJ032, KJ044, KJ059, KJ060, KJ070, KJ071, KJ072 o KJ073;

13. Un método de cultivo o desarrollo de una cepa bacteriana modificada genéticamente, que comprende inocular un medio de cultivo con una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, y cultivar o desarrollar dicha cepa bacteriana modificada genéticamente;

14. Un método de producción de succinato o malato, que comprende cultivar una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, bajo condiciones que permiten la producción de succinato o malato;

15. El método de acuerdo con el aspecto 14, en donde dicha una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente son KJ012, KJ034, KJ044, KJ059, KJ060, KJ070, KJ071, KJ072 o KJ073;

16. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 13, 14 o 15, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente se cultiva en un medio de sales minerales;

17. El método de acuerdo con el aspecto 16, en donde el medio de sales minerales comprende entre 2% y 20% (p/v) de carbohidrato;

18. El método de acuerdo con el aspecto 17, en donde el medio de sales minerales contiene 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5%, o 20% (p/v) de un azúcar;

19. El método de acuerdo con el aspecto 17 o 18, en donde el carbohidrato es glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, ramnosa, sacarosa, celobiosa, hemicelulosa, o varias combinaciones de las mismas;

20. El método de acuerdo con los aspectos 14, 15, 16, 17, 18 o 19, en donde el succinato o malato es producido a concentraciones de al menos 0,20M, 0,25M, 0,30M, 0,35M, 0,40M, 0,45M, 0,50M, 0,55M, 0,60M, 0,65M, o 0,70M;

21. El método de acuerdo con los aspectos 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, en donde el medio de cultivo es medio de sales minerales NBS o medio AM1 (véase la Tabla 4);

22. El método de acuerdo con los aspectos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21, en donde el rendimiento de succinato o malato es de por lo menos 90% o mayor (mayor o igual a 90%);

23. El método de acuerdo con el aspecto 22, en donde el rendimiento es de al menos 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, o 99%;

24. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 13-16 o 20-23, en donde el medio de crecimiento comprende glicerol como sustrato para la producción de succinato, malato o fumarato;

25. El método de acuerdo con los aspectos 17-19, en donde dicho medio también comprende glicerol como sustrato para la producción de succinato, malato o fumarato; o

26. Una composición que comprende una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, y un medio.

Las siguientes aspectos adicionales también son provistos por la presente solicitud:

1. Una cepa bacteriana modificada genéticamente que comprende modificaciones genéticas en los siguientes genes objetivo, que codifican: a) acetato cinasa, b) lactato deshidrogenasa, c) alcohol deshidrogenasa, d) piruvato-formiato liasa, e) metilglioxal sintasa, f) piruvato oxidasa, g) citrato liasa, h) aspartato aminotransferasa, i) transportador de formiato, j) fosfato acetiltransferasa, k) enzima málica, y l) propionato cinasa/α-cetobutirato-formiato liasa, anulando dichas modificaciones genéticas la actividad enzimática del polipéptido producido por dicho gen objetivo;

2. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con la realización 1, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es: *Escherichia coli, Gluconobacter oxydans, Gluconobacter asaii, Achromobacter delmarvae, Achromobacter viscosus, Achromobacter lacticum, Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium radiobacter, Alcaligenes faecalis, Arthrobacter citreus, Arthrobacter tumescens, Arthrobacter paraffineus, Arthrobacter hydrocarboglutamicus, Arthrobacter oxydans, Aureobacterium saperdae, Azotobacter indicus, Brevibacterium ammoniagenes, divaricatum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium flavum, Brevibacterium globosum, Brevibacterium fuscum, Brevibacterium ketoglutamicum, Brevibacterium helcolum, Brevibacterium pusillum, Brevibacterium testaceum, Brevibacterium roseum, Brevibacterium immariophilium, Brevibacterium linens, Brevibacterium protopharmiae, Corynebacterium acetophilum, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium callunae, Corynebacterium acetoacidophilum, Corynebacterium acetoglutamicum, Enterobacter aerogenes, Erwinia amylovora, Erwinia carotovora, Erwinia herbicola, Erwinia chrysanthemi, Flavobacterium peregrinum, Flavobacterium fucatum, Flavobacterium aurantinum, Flavobacterium rhenanum, Flavobacterium sewanense, Flavobacterium breve, Flavobacterium meningosepticum, Micrococcus sp.* CCM825*, Morganella morganii, Nocardia opaca, Nocardia rugosa, Planococcus eucinatus, Proteus rettgeri, Propionibacterium shermanii, Pseudomonas synxantha, Pseudomonas azotoformans, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas ovalis, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas acidovolans, Pseudomonas mucidolens, Pseudomonas testosteroni, Pseudomonas aeruginosa, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous, Rhodococcus sp.* ATCC 15592*, Rhodococcus sp.* ATCC 19070*, Sporosarcina ureae, Staphylococcus aureus, Vibrio metschnikovii, Vibrio tyrogenes, Actinomadura madurae, Actinomyces violaceochromogenes, Kitasatosporia parulosa, Streptomyces coelicolor, Streptomyces flavelus, Streptomyces griseolus, Streptomyces lividans, Streptomyces olivaceus, Streptomyces tanashiensis, Streptomyces virginiae, Streptomyces antibioticus, Streptomyces cacaoi, Streptomyces lavendulae, Streptomyces viridochromogenes, Aeromonas salmonicida, Bacillus pumilus, Bacillus circulans, Bacillus thiaminolyticus, Escherichia freundii, Microbacterium ammoniaphilum, Serratia marcescens, Salmonella typhimurium, Salmonella schottmulleri,* o *Xanthomonas citri;*

3. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con el aspecto 2, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es *Escherichia coli*.

4. Una cepa bacteriana modificada genéticamente que comprende:

(a) modificación genética de un gen de citrato liasa y uno o más de los siguientes genes objetivo que codifican: a) acetato cinasa, b) lactato deshidrogenasa, c) alcohol deshidrogenasa, d) piruvato-formiato liasa, e) metilglioxal sintasa, f) piruvato oxidasa, g) aspartato aminotransferasa, h) transportador de formiato, i) fosfato acetiltransferasa, j) enzima málica, y/o k) propionato cinasa/α-cetobutirato-formiato liasa; o

(b) modificación genética de un gen de citrato liasa, un gen de lactato deshidrogenasa, un gen de alcohol deshidrogenasa, un gen de acetato cinasa, un gen de transportador de formiato, un gen de piruvato-formiato liasa, un gen de metilglioxal sintasa, un gen de piruvato oxidasa, y uno o más de los siguientes genes objetivo: a) aspartato aminotransferasa, b) fosfato acetiltransferasa, c) enzima málica, y/o d) propionato cinasa/α-cetobutirato-formiato liasa; anulando dicha modificación genética la actividad enzimática del polipéptido producido por dicho gen objetivo;

5. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con el aspecto 4, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es *Escherichia coli, Gluconobacter oxydans, Gluconobacter asaii, Achromobacter*

delmarvae, Achromobacter viscosus, Achromobacter lacticum, Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium radiobacter, Alcaligenes faecalis, Arthrobacter citreus, Arthrobacter tumescens, Arthrobacter paraffineus, Arthrobacter hydrocarboglutamicus, Arthrobacter oxydans, Aureobacterium saperdae, Azotobacter indicus, Brevibacterium ammoniagenes, divaricatum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium flavum, Brevibacterium globosum, Brevibacterium fuscum, Brevibacterium ketoglutamicum, Brevibacterium helcolum, Brevibacterium pusillum, Brevibacterium testaceum, Brevibacterium roseum, Brevibacterium immariophilium, Brevibaclerium linens, Brevibacterium protopharmiae, Corynebacterium acetophilum, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium callunae, Corynebacterium acetoacidophilum, Corynebacterium acetoglutamicum, Enterobacter aerogenes, Erwinia amylovora, Erwinia carotovora, Erwinia herbicola, Erwinia chrysanthemi, Flavobacterium peregrinum, Flavobacterium fucatum, Flavobacterium aurantinum, Flavobacterium rhenanum, Flavobacterium sewanense, Flavobacterium breve, Flavobacterium meningosepticum, Micrococcus sp. CCM825*, Morganella morganii, Nocardia opaca, Nocardia rugosa, Planococcus eucinatus, Proteus rettgeri, Propionibacterium shermanii, Pseudomonas synxantha, Pseudomonas azotoformans, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas ovalis, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas acidovolans, Pseudomonas mucidolens, Pseudomonas testosteroni, Pseudomonas aeruginosa, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous, Rhodococcus sp.* ATCC 15592*, Rhodococcus sp.* ATCC 19070*, Sporosarcina ureae, Staphylococcus aureus, Vibrio metschnikovii, Vibrio tyrogenes, Actinomadura madurae, Actinomyces violaceochromogenes, Kitasatosporia parulosa, Streptomyces coelicolor, Streptomyces flavelus, Streptomyces griseolus, Streptomyces lividans, Streptomyces olivaceus, Streptomyces tanashiensis, Streptomyces virginiae, Streptomyces antibioticus, Streptomyces cacaoi, Streptomyces lavendulae, Streptomyces viridochromogenes, Aeromonas salmonicida, Bacillus pumilus, Bacillus circulans, Bacillus thiaminolyticus, Escherichia freundii, Microbacterium ammoniaphilum, Serratia marcescens, Salmonella typhimurium, Salmonella schottmulleri,* o *Xanthomonas citri;*

6. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con el aspecto 5, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es *Escherichia coli*;

7. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con el aspecto 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente está evolucionada metabólicamente;

8. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con el aspecto 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en donde el gen objetivo, o porciones del mismo, o genes objetivo, o porciones de los mismos, son desactivados por supresión, mutaciones de desplazamiento de marco, mutaciones puntuales, inserción de codones de detención, o combinaciones de los mismos;

9. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con el aspecto 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente no contiene ni un gen exógeno ni un fragmento del mismo, o solo contiene genes nativos;

10. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con los aspectos 1, 2, 3, 4, 5, o 6, con la condición de que: 1) dicha cepa bacteriana modificada genéticamente no debe tener uno o más de las siguientes enzimas desactivadas: a) fumarato reductasa b) ATP sintasa; c) 2-cetoglutarato deshidrogenasa; d) succinato deshidrogenasa; e) transportador de glucosa; f) represor de isocitrato liasa; y/o 2) que dicha cepa modificada genéticamente no contenga un plásmido o un plásmido multicopia que codifique o exprese en exceso malato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, piruvato carboxilasa, o citrato sintasa;

11. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con el aspecto 7, 8, 9, 10, u 11, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente está evolucionada metabólicamente;

12. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1-10, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente produce: a) concentraciones de succinato de al menos 200 mM, 250 mM 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 550 mM, 600 mM, 650 mM, o 700 mM; b) concentraciones de fumarato de al menos 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 550 mM, 600 mM, 650 mM, o 700 mM; o c) concentraciones de malato de al menos 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM o 500 mM;

13. Una cepa bacteriana modificada genéticamente, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es KJ012, KJ017, KJ032, KJ044, KJ059, KJ060, KJ070, KJ071, KJ072, KJ073, KJ091, KJ098, KJ104, KJ110, KJ119, KJ122, o KJ134;

14. Un método de cultivo o desarrollo de una cepa bacteriana modificada genéticamente, que comprende inocular un medio de cultivo con una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1-13, y cultivar o desarrollar dicha cepa bacteriana modificada genéticamente;

15. Un método de producción de succinato, fumarato o malato, que comprende cultivar una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1-13, bajo condiciones que permiten la producción de succinato o malato o fumarato.

16. El método de acuerdo con el aspecto 15, en donde dichas cepas bacterianas modificadas genéticamente son KJ012, KJ017, KJ032, KJ044, KJ059, KJ060, KJ070, KJ071, KJ072, KJ073, KJ091, KJ098, KJ104, KJ110, KJ119, KJ122, o KJ134;

17. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 14-16, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente se cultiva en un medio de sales minerales;

18. El método de acuerdo con el aspecto 17, en donde el medio de sales minerales comprende entre 2% y 20% (p/v) de carbohidrato;

19. El método de acuerdo con el aspecto 18, en donde el medio de sales minerales contiene 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, 10%, 10,5%, 11%, 11,5%, 12%, 12,5%, 13%, 13,5%, 14%, 14,5%, 15%, 15,5%, 16%, 16,5%, 17%, 17,5%, 18%, 18,5%, 19%, 19,5%, o 20% (p/v) de un azúcar;

20. El método de acuerdo con el aspecto 18 o 19, en donde el carbohidrato es glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, ramnosa, sacarosa, celobiosa, hemicelulosa, o combinaciones de las mismas;

21. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 15-20, en donde el rendimiento de succinato o malato es mayor o igual que 90%;

22. El método de acuerdo con el aspecto 21, en donde el rendimiento es de al menos 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, o 99%;

23. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 15-22, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente produce concentraciones de succinato de al menos 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 550 mM, 600 mM, 650 mM, o 700 mM;

24. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 15-22, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente produce concentraciones de malato de al menos 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM o 500 mM;

25. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 15-22, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente produce concentraciones de fumarato de al menos 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 550 mM, 600 mM, 650 mM, o 700 mM;

26. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 14-17 o 21-25, en donde el medio de crecimiento comprende glicerol como sustrato para la producción de succinato, malato o fumarato;

27. El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 18-20, en donde dicho medio también comprende glicerol como sustrato para la producción de succinato, malato o fumarato; o

28. Una composición que comprende una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente de acuerdo con los aspectos 1-13, y un medio.

Los microorganismos se depositaron como se indica en los ejemplos en la Colección de Cultivos del Servicio de Investigación Agrícola, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604 Estados Unidos. Estos cultivos se depositaron bajo condiciones que aseguran la disponibilidad de los cultivos durante el trámite de esta solicitud de patente para la persona designada por el Comisionado de Patentes y Marcas, de acuerdo con 37 CFR 1.14 y 35 USC 122. Los depósitos están disponibles según se requiera en la legislación de patentes extranjeras en los países donde se presentan las contrapartes de la presente solicitud, o su progenie. Sin embargo, se debe entender que la disponibilidad de los depósitos no constituye una licencia para practicar la presente descripción al derogarse los derechos de patente concedidos por la acción gubernamental.

Además, los presentes depósitos de cultivos serán almacenados y se pondrán disponibles al público de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, esto es, serán almacenados con todo el cuidado necesario para mantenerlos viables y no contaminados durante un periodo de al menos 5 años después de la solicitud más reciente de suministro de una muestra de los depósitos, y en cualquier caso, durante un periodo de al menos 30 (treinta) años después de la fecha de depósito o durante la vigencia de cualquier patente que pueda expedirse que revele los cultivos. El depositante reconoce la obligación de reemplazar los depósitos si el depositario fuera incapaz de suministrar una muestra cuando se le requiera, debido a la condición de los depósitos. Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público de los presentes depósitos de cultivo serán retiradas irrevocablemente tras la concesión de una patente que los revela.

A continuación se dan ejemplos que ilustran los procedimientos para la práctica de la descripción. Estos ejemplos no se deben considerar limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezcla de disolvente son en volumen, a menos que se indique de otra manera.

Ejemplo 1

Los microorganismos se depositaron en la Colección de Cultivos ARS de la siguiente manera:

Cultivo	Designación de cepa	Fecha de depósito
KJ012	B-50022	15 de marzo de 2007
KJ017	B-50023	15 de marzo de 2007
KJ032	B-50024	15 de marzo de 2007
KJ060	B-50025	15 de marzo de 2007
KJ070	B-50026	15 de marzo de 2007
KJ071	B-50027	15 de marzo de 2007
KJ072	B-50028	15 de marzo de 2007
KJ073	B-50029	15 de marzo de 2007

Materiales y métodos

Cepas, medios y condiciones de crecimiento

Las cepas usadas en este estudio se resumen en la Tabla 2. Los derivados de *E. coli* C (ATCC 8739) se desarrollaron para la producción de succinato mediante una combinación única de supresiones de gen y selecciones para aumentar la productividad. Los cultivos se desarrollaron a 37°C en caldo modificado de Luria-Bertani (LB) (por litro: 10 g de triptona Difco, 5 g de extracto de levadura Difco, 5 g de cloruro de sodio) (Miller, 1992), solo durante la construcción de la cepa. Se incluyeron antibióticos según fuera adecuado.

En la mayoría de los estudios y para el mantenimiento de las cepas se usó como caldo de fermentación un medio de sales minerales NBS (Causey *et al.,* 2004) con un suplemento de $KHCO_3$100 mM, betaína HCl 1 mM, y azúcar (2% a 10%). Durante las últimas etapas de esta investigación se desarrolló un medio nuevo, bajo en sales, AMI (4,2 g l^{-1} en total de sales; Martínez *et al.,* 2007), y se usó en las fermentaciones con KJ060 y KJ073. A este medio se le añadió un suplemento de $KHCO_3$ 100 mM y azúcar como se indica, e incluye betaína 1 mM cuando la concentración inicial de azúcar es de 5% o más alta. En las cepas desarrolladas para la producción de succinato no están presentes genes que codifican resistencia a antibiótico, plásmidos, ni otros genes foráneos, excepto como intermedios durante la construcción.

Métodos genéticos

Los plásmidos y cebadores usados en este estudio se resumen en la Tabla 2. Los métodos para supresiones cromosómicas, integración, y eliminación de genes de resistencia a antibiótico, se han descrito previamente (Datsenko y Wanner, 2000; Grabar *et al.,* 2006; Posfai *et al.,* 1997; Zhou *et al.,* 2006). Los cebadores efectores contienen secuencias que corresponden al extremo N de cada gen objetivo (en negrita) seguidas por 20 p.b. (subrayados) que corresponden a la casete FRT-*kan*-FRT. Los cebadores antisentido contienen secuencias que corresponden a la región C-terminal de cada gen objetivo (en negrita), seguidas por 20 p.b. (subrayados) que corresponden a la casete. Fragmentos de ADN amplificados se sometieron a electroporación en cepas de *E. coli* que alojan recombinasa *Red* (pKD46). En los recombinantes resultantes, la casete FRT-*kan*-FRT reemplazó a la región suprimida del gen objetivo por recombinación homóloga (evento de doble cruzamiento). Subsiguientemente, el gen de resistencia (FRT-*kan*-FRT) se cortó del cromosoma con recombinasa FLP usando el plásmido pFT-A, dejando una región de cicatriz que contiene un sitio FRT. Las supresiones e integraciones cromosómicas se verificaron analizando por marcadores de antibiótico, análisis de PCR y análisis de productos de fermentación. Se usó transducción de fago P1 generalizada (Miller, 1992) para transferir la mutación Δ*focA-pflB*::FRT-*kan*-FRT de la cepa SZ204 a la cepa KJ017, para producir KJ032.

Supresión de los genes mgsA y poxB

Se desarrolló un método modificado para suprimir genes cromosómicos de *E. coli* usando un proceso de recombinación homóloga de dos pasos (Thomason *et al.,* 2005). Con este método, no quedan en el cromosoma genes de antibiótico ni secuencias de cicatriz después de la supresión del gen. En la primera recombinación, parte del gen objetivo fue reemplazada por una casete de ADN que contenía un gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y un gen de levano sucrasa (*sacB*). En la segunda recombinación, la casete *cat-sacB* se reemplazó por secuencias nativas omitiendo la región de supresión. Las células que contienen el gen *sacB* acumulan levano durante la incubación con sacarosa y son destruidas. Los recombinantes supervivientes están altamente enriquecidos en cuanto a la pérdida de la casete *cat-sacB*.

Se construyó una casete para facilitar las supresiones de genes. La región *cat-sacB* se amplificó partiendo de pEL04 (Lee *et al.,* 2001; Thomason *et al.,* 2005) mediante PCR usando la serie de cebadores JM*catsacB* (Tabla 2), se digirió con *Nhe1*, y se ligó en el sitio correspondiente de pLOI3421 para producir pLOI4151. La casete *cat-sacB* se amplificó por PCR usando pLOI4151 (molde) y la serie de cebadores *cat*-up2/*sacB*-down2 (sitio *EcoRV* incluido en cada cebador), se digirió con *EcoRV*, y se usó en ligaciones subsiguientes.

El gen *mgsA* y regiones vecinas de 500 p.b. (*yccT'-mgsA-helD'*, 1435 p.b.) se amplificaron usando la serie de cebadores *mgsA*-up/down y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen), para producir el plásmido pLOI4228. Una preparación diluida 1000 veces de este ADN plasmídico sirvió como molde para la amplificación inversa usando la serie de cebadores *mgsA*-1/2 (ambos cebadores dentro del gen *mgsA* y mirando hacia fuera). El fragmento resultante de 4958 p.b. que contenía el replicón, se ligó en la casete *cat-sacB* digerida con *EcoRV* amplificada de pLOI4151, para producir pLOI4229. Este fragmento de 4.958 p.b. también se usó para construir un segundo plásmido, pLOI4230 (fosforilación y autoligación). En pLOI4230, la región central de *mgsA* está ausente (*yccT'-mgsA'-mgsA"- helD'*).

Después de la digestión de pLOI4229 y pLOI4230 con *XmnI* (dentro del vector), cada uno sirvió como molde para la amplificación usando la serie de cebadores *mgsA-up/down* para producir los fragmentos de ADN lineales para el paso de integración I (*yccT'-mgsA'-cat-sacB-mgsA"-helD'*) y el paso II (*yccT'-mgsA'-mgsA''-helD'*), respectivamente. Después de la electroporación del fragmento del paso I en KJ060, que contenía pKD46 (recombinasa Red) y 2 h de incubación a 30°C para permitir la expresión y segregación, los recombinantes se seleccionaron por resistencia al cloranfenicol (40 mg l^{-1}) y ampicilina (20 mg l^{-1}) sobre placas (30°C, 18 h). Se escogieron tres clones, se desarrollaron en caldo de Luria con ampicilina y 5% p/v de arabinosa, y se prepararon para la electroporación. Después de la electroporación con el fragmento del paso II, las células se incubaron a 37°C durante 4 horas y se transfirieron a un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de LB modificado (tampón MOPS 100 mM añadido y NaCl omitido), que contenía 10% de sacarosa. Después de incubación durante la noche (37°C), se seleccionaron clones sobre placas de LB modificado (sin NaCl; MOPS 100 mM añadido), que contenían 6% de sacarosa (39°C, 16 h). Los clones resultantes se sometieron a ensayo para determinar la pérdida de resistencia a ampicilina y cloranfenicol. La construcción se confirmó adicionalmente por análisis de PCR. Se seleccionó un clon que carecía del gen *mgsA* y se designó como KJ070.

El gen *poxB* se suprimió de KJ071 de manera análoga a la que se usó para suprimir el gen *mgsA*. Las series de cebadores adicionales (*poxB*-up/down y *poxB*-1/2) usadas para construir la supresión de *poxB* se incluyen en la Tabla 2, junto con los plásmidos correspondientes (pLOI4274, pLOI4275, y pLOI4276). La cepa resultante se designó KJ072.

Análisis enzimático

Las células se desarrollaron en medio NBS con 5% o 10% de glucosa, y se cosecharon durante el crecimiento semilogarítmico por centrifugación (8.000 g durante 5 minutos a 4°C), se lavaron con tampón Tris-HCl 100 mM frío (pH 7,0), y se volvieron a suspender en el mismo tampón (5 ml). Las células se rompieron por tratamiento con cuentas de vidrio (MP Biomedicals; Solon, Ohio) y después se centrifugaron a 13.000 g durante 15 minutos para obtener el extracto bruto. Las proteínas se midieron mediante el método BCA, con albúmina de suero bovino como patrón (Protein Assay Kit de Pierce BCA).

La actividad de PEP carboxilasa se midió como se describió antes (Canovas y Romberg, 1969). La mezcla de reacción contiene tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, NADH 0,2 mM, 20 U de malato deshidrogenasa, y PEP 10 mM. La reacción se inició con la adición del extracto bruto. La actividad de PEP carboxi cinasa se midió como se describió antes (Van der Werf *et al.,* 1997). La mezcla de reacción contiene tampón MES 100 mM (pH 6,6), $MgCl_2$ 10 mM, $NaHCO_3$ 75 mM, $MnCl_2$ 5 mM, ADP 50 mM, DTT 1 mM, NADH 0,2 mM, 20 U de malato deshidrogenasa, y PEP 10 mM. La reacción se inició con la adición del extracto bruto.

La actividad de la enzima málica dependiente de NAD^+ se midió en ambas direcciones como se describió antes (Stols y Donnelly, 1997). Para dirigir la carboxilación, la mezcla de reacción contiene tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), $NaHCO_3$ 25 mM, $MnCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM, NADH 0,2 mM, y piruvato 25 mM. La reacción se inició agregando el extracto bruto. Sin embargo, este método de análisis no puede medir la actividad de la enzima málica en *E. coli* C de tipo salvaje debido a la presencia de lactato deshidrogenasa. Para la descarboxilación, la mezcla de reacción contiene tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NAD^+ 2,5 mM, DTT 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 20 mM y L-malato 20 mM. La reacción se inició agregando el extracto bruto.

La actividad de la enzima málica dependiente de $NADP^+$ se midió de la misma forma que la enzima málica dependiente de $NADP^+$, excepto que el $NAD(H)^+$ fue reemplazado por $NADP(H)^+$. Se definió 1 unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para oxidar o reducir 1 nmol de sustrato por minuto.

Análisis de RT-PCR de tiempo real

Se usó RT-PCR de tiempo real para medir los niveles de ARN mensajero como se describió previamente (Jarboe *et al.,* 2008). Las células se desarrollaron en medio NBS con 5% o 10% de glucosa y se cosecharon durante el crecimiento semilogarítmico, agitando en un baño de hielo seco/etanol, seguido por centrifugación y almacenamiento

a -80°C en RNALater (Qiagen, Valencia California), hasta purificación. Se realizó la purificación de ARN con columnas RNeasy Minicolumn (Qiagen), seguido por digestión con DNaseI (Invitrogen). En la transcripción inversa con Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, California) se usaron como molde 50 ng de ARN en total. La PCR de tiempo real se realizó en un Bio-Rad iCycler con una mezcla SYBR Green RT-PCR (Bio-Rad, Hercules, California). Se verificó si el ARN tenía contaminación de ADN genómico ejecutando una RT-PCR en ausencia de transcripción inversa. La abundancia de transcrito se estimó usando ADN genómico como estándar y los grados de expresión se normalizaron por medio del gen *birA*, un represor de transcripción (Jarboe *et al.,* 2008). Los cebadores de RT-PCR usados para *pck* y *birA* se enumeran en la tabla 2.

Secuenciación de la región pck

Para saber si había ocurrido alguna mutación en el gen *pck* de KJ073, la región codificante y la región promotora (aproximadamente 800 p.b. delante de la región codificante) del gen *pck,* tanto en KJ012 como en KJ073, se amplificaron por medio de PfuUltra High Fidelity DNA Polymerase (Stratagene; Wilmington, Delaware). Se usó la serie de cebadores *pck*-F/R para amplificar la región codificante por medio del terminador de transcripción. La serie de cebadores *pck*-2 se usó para amplificar la región promotora. La secuenciación de ADN fue provista por el Centro Interdisciplinario de Investigación de Biotecnología de la Universidad de Florida (con autosecuenciadores de Applied Biosystems).

Fermentaciones

Se desarrollaron cultivos de siembra y fermentaciones a 37°C, 100 rpm, en medio de sales minerales NBS o AM1 que contenían glucosa, $KHCO_3$ 100 mM y betaína HCl 1 mM. Estos se mantuvieron a pH 7,0 mediante la adición automática de KOH durante los experimentos iniciales. Subsiguientemente el pH se mantuvo agregando una mezcla 1:1 de K_2CO_3 3 M y KOH 6N. Las fermentaciones se efectuaron en pequeños recipientes de fermentación con un volumen de trabajo de 350 ml. Las fermentaciones se inocularon a una DO_{550} inicial de 0,01 (3,3 mg de peso seco celular l^{-1}) o 0,1 (33,3 mg de peso seco celular l^{-1}), como se indica. En las cepas que se probaron no estuvieron presentes genes de resistencia a antibiótico. Los recipientes de fermentación se sellaron excepto por una aguja de calibre 16 que sirvió como una ventilación para la retirada de muestras. La anaerobiosis se alcanzó rápidamente durante el crecimiento, sirviendo el bicarbonato añadido para asegurar una atmósfera de CO_2.

Análisis

La masa celular se estimó a partir de la densidad óptica a 550 nm (DO 1,0 = 333 mg de peso seco de célula l^{-1}) con un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 70. Se determinaron los ácidos orgánicos y azúcares usando cromatografía líquida de alta resolución (Grabar *et al.,* 2006).

Resultados y discusión

Construcción de KJ012 para la producción de succinato: supresión de IdhA, adhE, y ackA

Por mucho, la mayor parte del conocimiento científico sobre *E. coli* deriva de las investigaciones en un medio complejo tal como el caldo de Luria, en lugar de un medio de sales minerales usando concentraciones bajas de sustratos de azúcar (típicamente 0,2% p/v; 11 mM), en lugar del 5% (p/v) de glucosa (278 mM) y 10% p/v (555 mM) de glucosa usados en los estudios referidos en la presente memoria. Se requieren grandes cantidades de azúcar para producir cantidades comercialmente significativas de producto. Investigadores anteriores han descrito la construcción de muchos derivados de *E. coli* para la producción de succinato en medio complejo (Tabla 1). Con el medio complejo, el diseño racional basado en las rutas primarias ha sido razonablemente exitoso para demostraciones académicas de ingeniería metabólica. Sin embargo, el uso de nutrientes complejos para la producción de productos de fermentación bacteriana aumenta el costo de los materiales, el costo de la purificación, y el costo asociado con la eliminación de desechos. El uso de un medio de sales minerales, sin componentes de medio complejos debe ser mucho más rentable.

La *E. coli* C crece bien en medio de sales minerales NBS que contiene glucosa, y produce una mezcla de lactato, acetato, etanol y succinato como productos de fermentación (Fig. 1A; Tabla 3). A diferencia de otros estudios con *E. coli* (Tabla 1), los estudios aquí referidos se han centrado en el desarrollo de cepas que son capaces de convertir una cantidad alta de azúcares en succinato usando un medio de sales minerales para minimizar los costos de materiales, la purificación de succinato y la eliminación de desechos. Por inspección de la Figura 1 que ilustra las rutas de fermentación convencionales generalmente aceptadas para *E. coli*, se ideó un diseño racional para la ingeniería metabólica de una cepa productora de succinato, en la que se hicieron supresiones en genes que codifican los pasos finales de todos los productos alternativos: lactato (*IdhA*), etanol (*adhE*) y acetato (*ackA*). Los resultados de esta ingeniería metabólica por diseño racional fueron completamente inesperados. La cepa resultante (KJ012) creció muy débilmente bajo condiciones anaeróbicas en un medio de sales minerales que contenía 5% de glucosa (278 mM), y produjo acetato en lugar de succinato como el producto de fermentación primario. Contrario a las expectativas del diseño racional, el succinato permaneció como un producto menor. Los rendimientos molares de succinato basados en la glucosa metabolizada no cambiaron como resultado de estas mutaciones, 0,2 moles de succinato por mol de glucosa para el progenitor y KJ012 durante la fermentación en medio de sales minerales NBS que contenía 5% de glucosa. Los autores de la presente invención confirmaron que un medio de sales minerales

NBS contiene todos los nutrientes minerales necesarios para el crecimiento de KJ012, incubando bajo condiciones aeróbicas (matraz agitado aeróbico; 5% de glucosa). En matraces agitados aeróbicos, los rendimientos celulares para KJ012 fueron 5 veces más altos que durante el crecimiento anaeróbico, y 75% del rendimiento de *E. coli* C (progenitor) durante el crecimiento anaeróbico. Estos resultados también confirmaron que todas las rutas biosintéticas centrales permanecen funcionales en KJ012.

Cuando estuvieron presentes nutrientes complejos (caldo de Luria), la producción fermentativa de succinato en KJ012 aumentó 20 veces en comparación con KJ012 en medio de sales mínimo, y el rendimiento molar para succinato aumentó 3,5 veces. Claramente, el diseño racional basado en las rutas primarias es más adecuado para demostraciones académicas o para procesos de diseño destinados a usarse con nutrientes complejos.

La base del crecimiento débil, la producción baja de succinato y el aumento de la producción de acetato en KJ012 (Δ*ldhA*::FRT Δ*adhE*::FRT Δ*ackA*::FRT) durante el metabolismo anaeróbico en el medio de sales minerales, es desconocida. Estas son consecuencias inesperadas que resultaron de la ingeniería metabólica usando el diseño racional basado en los mapas de la ruta estándar. Claramente, en un medio mínimo los diseños racionales para ingeniería metabólica no son predecibles. La cepa resultante, KJ012, fue inferior al progenitor en crecimiento y no fue mejor que el progenitor para la producción de succinato.

Desarrollo de KJ017 para la producción de succinato por selección de KJ012 basada en crecimiento

KJ012 (Δ*dhA*::FRT Δ*adhE*::FRT Δ*ackA*::FRT) creció débilmente en comparación con la *E. coli* C progenitora, exhibió velocidades de producción de succinato más bajas y no dio mejores rendimientos molares (Tabla 3). A pesar de estos resultados, se intentó la transferencia en serie de esta cepa como un método para co-seleccionar crecimiento y producción de succinato mejorados basándose en el siguiente razonamiento. Generalmente se piensa que la ruta principal para la fermentación de glucosa a succinato (Fig. 1A y Fig. 2A) utiliza fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) para el paso de carboxilación (Unden y Kleefeld, 2004; Fraenkel 1996; Keseler *et al.,* 2005; Millard *et al.,* 1996; Gottschalk, 1985; Karp *et al.,* 2007). Esta enzima de carboxilación no conserva el fosfato de alta energía en el fosfoenolpiruvato y disminuye el ATP neto disponible para el crecimiento. Se pueden contemplar rutas alternativas para la producción de succinato usando el repertorio conocido de genes de *E. coli* que podrían aumentar los rendimientos de ATP y podrían así aumentar el crecimiento (Fig. 1A; Fig. 2B, 2C y 2D). Sin embargo, se ha observado que ninguna de estas rutas alternativas funciona para la producción de succinato durante la fermentación con cepas nativas de *E. coli*. Las enzimas clave en estas rutas alternativas están reprimidas por glucosa y normalmente se activan durante la gluconeogénesis. Típicamente, los niveles de estas enzimas gluconeogénicas varían inversamente con la disponibilidad de glucosa y otros metabolitos (Goldie y Sanwal, 1980a; Wright y Sanwal, 1969; Sanwal y Smando, 1969a), y funcionan en dirección inversa, descarboxilación (Keseler *et al.,* 2005; Oh *et al.,* 2002; Kao *et al.,* 2005; Stols y Donnelly, 1997; Samuelov *et al.,* 1991; Sanwal, 1970a; Delbaere *et al.,* 2004; Goldie y Sanwal, 1980b; Sanwal y Smando, 1969b; Sanwal 1970b).

La enzima clave para una de estas, la enzima málica ligada a NADH (*sfcA*) (Fig. 2B), ha mostrado ser capaz de aumentar la producción de succinato en *E. coli,* pero requiere la expresión en exceso de un plásmido para hacerlo así (Stols y Donnelly, 1997). Sin embargo, sería de esperar que ninguna de estas rutas alternativas fuera funcional en cepas nativas de *E. coli* o KJ012 durante el crecimiento anaeróbico con altos niveles de glucosa. Las transferencias en serie de KJ012 con selección por crecimiento mejorado ofrecen una oportunidad para seleccionar la activación mutacional de rutas alternativas para la producción de succinato (Fig. 1B), que mantienen el equilibrio rédox y aumentan los rendimientos de ATP.

KJ012 fue transferida en serie en medio de glucosa NBS bajo condiciones fermentativas tan rápidamente como lo permitió el crecimiento (Fig. 3A; Fig. 4A; Fig. 5). El crecimiento permaneció lento, requiriéndose 4-5 días de incubación entre las primeras 9 transferencias, después aumentó notablemente permitiendo hacer las transferencias a intervalos de 24 horas. Este evento fue acompañado por un aumento de acetato (Fig. 4A), con poca mejora en la producción de succinato. Después de 27 transferencias (60 días), el KOH se reemplazó con una mezcla 1:1 de K_2CO_3 3M y KOH 6N para proveer dióxido de carbono adicional (100 mM añadidos inicialmente a todo el medio de sales minerales NBS). La continuación de las transferencias mejora la producción de succinato. Se hicieron un total de 40 transferencias en glucosa al 5% (227 mM), seguido por otras 40 transferencias en glucosa al 10% (555 mM). Durante las transferencias en glucosa al 10%, los rendimientos de succinato permanecieron en aproximadamente 0,7 moles por mol de glucosa metabolizada, con lactato, acetato y formiato como co-productos (Tabla 3). Este rendimiento fue 3 veces más alto que el de *E. coli* C y KJ012. Se aisló un clon y se designó como KJ017. La selección para las mejoras en el crecimiento de KJ012 para producir KJ017 co-seleccionó mejoras en la producción de succinato (velocidad, título, y rendimiento molar).

Base fisiológica del incremento de producción de succinato por KJ017

El succinato producido por *E. coli* usando la ruta considerada generalmente como la ruta de fermentación nativa (fosfoenolpiruvato carboxilasa; *ppc*) consume la energía del fosfoenolpiruvato produciendo fosfato inorgánico. Se pierde un ATP por succinato producido mediante esta ruta (Fig. 1; Fig. 6). La conservación de esta energía como ATP usando sistemas de enzima alternativos representa una oportunidad para aumentar el crecimiento celular y co-seleccionar un incremento de producción de succinato. Basándose en genes conocidos de *E. coli*, se contempla que

otras tres rutas de enzima para producción de succinato conservarían ATP y así aumentarían el crecimiento (Fig. 1; Fig. 6). Sin embargo, se piensa que todos los pasos de carboxilación en estas rutas alternativas funcionan en dirección inversa (descarboxilación), principalmente por gluconeogénesis, durante el crecimiento sobre sustratos tales como ácidos orgánicos (Keseler *et al.,* 2005; Oh *et al.,* 2002; Kao *et al.,* 2005; Stols y Donnelly, 1997; Samuelov *et al.,* 1991; Sanwal, 1970a; Delbaere *et al.,* 2004; Goldie y Sanwal, 1980b; Sanwal y Smando, 1969b; Sanwal 1970b). Para probar la hipótesis de que la selección basada en crecimiento para desarrollar KJ017 ha activado en realidad una o más de estas rutas alternativas, se compararon actividades específicas de los pasos clave de carboxilación (Tabla 4). Tres de estas fueron similares o más bajas en *E. coli* C, KJ012, y KJ017. La energía que conserva la fosfoenolpiruvato carboxi cinasa (*pck*) se incrementó 4 veces en KJ017 en comparación con KJ012, coherente con la hipótesis de que la selección por crecimiento mejorado co-seleccionaría un incremento de producción de succinato por medio del incremento de los rendimientos de ATP, una consecuencia del incremento de la expresión de una ruta conservadora de energía para la producción de succinato.

Se usaron selecciones ulteriores basadas en crecimiento y supresiones de gen adicionales para construir muchas cepas adicionales con más mejoras en el crecimiento y la producción de succinato (Fig. 3 y Fig. 4). También se examinaron los niveles de enzima en una de estas, KJ073. En esta cepa, la actividad *in vitro* de la fosfoenolpiruvato carboxi cinasa aumentó adicionalmente a 8 veces la de KJ017, mientras que las otras enzimas de carboxilación permanecieron esencialmente sin cambio (Tabla 4).

El *pck* y regiones circundantes se clonaron de KJ012 y KJ073, y se secuenciaron. No se encontraron cambios en la región codificante. En ausencia de modificaciones posteriores a la traducción, las propiedades catalíticas de la enzima estarían sin cambio. Se detectó una sola mutación en la región promotora de *pck*, G a A, en el sitio -64 p.b. con respecto al sitio de iniciación de traducción. Esta mutación estaba detrás del sitio de iniciación de transcripción, que es el sitio -139 p.b. con respecto al sitio de iniciación de traducción. La restauración de esta secuencia (A a G) en KJ073 a la de *E. coli* C, no afectó al crecimiento celular, la fermentación, ni la producción de succinato, indicando que esta mutación no es esencial (datos no mostrados). La RT-PCR confirmó que los niveles de mensaje estaban elevados en KJ073. Estos resultados son coherentes con una mutación reguladora como la base del incremento de expresión de *pck*.

Investigadores anteriores habían notado que los parámetros cinéticos de fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) y fosfoenolpiruvato carboxi cinasa (*pck*) podían tener efectos importantes sobre la carboxilación y la producción de succinato (Millard *et al.,* 1996; Kim *et al.,* 2004). La Km hacia bicarbonato para fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) de *E. coli* es de 0,15 mM (Morikawa *et al.,* 1980), 9 veces más baja (13 mM) que fosfoenolpiruvato carboxi cinasa (*pck*) de *E. coli* (Krebs y Bridger 1980). Aunque la expresión en exceso de *pck* de *E. coli* en un plásmido multicopia aumentó 50 veces se informó que la actividad de fosfoenolpiruvato carboxi cinasa no tenía efecto sobre la producción de succinato (Millard *et al.,* 1996). La producción de succinato tampoco aumentó cuando la fosfoenolpiruvato carboxi cinasa de *Anaerobiospirillum succiniciproducens* fue expresada en exceso en *E. coli* K12 (Kim *et al.,* 2004). Esta enzima también tiene una Km alta para bicarbonato (30 mM; Laivenieks *et al.,* 1997). Sin embargo, cuando *pck de A. succiniciproducens* fue expresada en exceso en un mutante *ppc* de *E. coli* K12, la producción de succinato aumentó 6,5 veces (Kim *et al.,* 2004). En KJ017 y derivados subsiguientes, claramente la fosfoenolpiruvato carboxi cinasa es la actividad de carboxilación dominante, incluso en presencia de fosfoenol piruvato carboxilasa nativa funcional.

Los resultados de las mediciones de enzima de *E. coli* C fueron muy sorprendentes. La enzima considerada generalmente como la responsable de la actividad dominante de carboxilación en la producción de succinato por *E. coli* nativa (fosfoenolpiruvato carboxilasa; *ppc*) durante el crecimiento (Unden y Kleefeld, 2004; Fraenkel 1996; Keseler *et al.,* 2005; Millard *et al.,* 1996; Gottschalk 1985; Karp *et al.,* 2007), no fue la enzima más activa *in vitro* en *E. coli* C. De esta manera, las rutas metabólicas generalmente aceptadas para *E. coli* (Unden y Kleefeld, 2004; Fraenkel 1996; Sánchez *et al.,* 2006; Cox *et al.,* 2006; Vemuri *et al.,* 2002a; Wang *et al.,* 2006; Sánchez *et al.,* 2005ab; Gokarn *et al.,* 2000; Karp *et al.,* 2007), en las cuales típicamente se basan el diseño racional de ingeniería metabólica y las estimaciones de flujo metabólico, pueden no reflejar con precisión el metabolismo de todas las cepas. Bajo condiciones de saturación de sustrato *in vitro*, la actividad de fosfoenolpiruvato carboxi cinasa fue la más alta. En *E. coli* K12, se informó que las actividades tanto de fosfoenolpiruvato carboxilasa como de fosfoenolpiruvato carboxi cinasa eran iguales *in vitro* (140 nM min^{-1} mg^{-1} de proteína celular, Van der Werf *et al.,* 1997), sirviendo la primera como la ruta primaria para succinato.

Estudios previos mostraron que la expresión en exceso de un gen *ppc* nativo en *E. coli* dio como resultado una producción de succinato específica más alta (Millard *et al.,* 2000), velocidad de crecimiento específico más alta, y producción de acetato específica más baja, debido a más carboxilación de PEP para reabastecer los intermedios del ciclo de TCA (Farmer y Liao, 1997). Sin embargo, puesto que se requiere PEP para el sistema de transporte de glucosa, la expresion en exceso de *ppc* también disminuye la velocidad de captación de glucosa en 15%-40% sin aumentar significativamente el rendimiento de succinato (por glucosa), en comparación con un control isogénico (Chao y Liao, 1993; Gokarn *et al.,* 2000). Esta incapacidad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa nativa para aumentar los rendimientos de succinato desvió la mayor parte de la atención de investigación a un nuevo diseño metabólico, la expresion en exceso de la PYC (piruvato carboxilasa) de *Lactobacillus lactis* o *Rhizobium etli* como el paso de carboxilación (Vemuri *et al.,* 2002ab; Gokarn *et al.,* 2000; Lin *et al.,* 2005abc), en lugar de proseguir con el trabajo con el repertorio nativo de los genes de *E. coli*.

Bacterias del rumen tales como *Actinobacillus succinogenes* producen succinato como un producto primario durante la fermentación de glucosa, usando la energía que conserva fosfoenolpiruvato carboxi cinasa para la carboxilación (Kim *et al.,* 2004; McKinlay *et al.,* 2005; McKinlay y Vieille, 2008). Las actividades referidas para este organismo son 5 veces las de KJ017, y la mitad de las obtenidas por selección basada en crecimiento continuo (evolución metabólica) de KJ073. De esta manera, usando una combinación de ingeniería metabólica (*ldhA, adhE, ackA*) y evolución metábolica (selección de mayor eficiencia de producción de ATP basada en el crecimiento), los estudios aquí referidos demuestran el desarrollo de cepas de *E. coli* productoras de succinato que se asemejan a un organismo del rumen tal como *A. succinogenes*, usando solamente el repertorio nativo de genes de *E. coli*. A pesar de los informes anteriores de que la expresion en exceso de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) de *E. coli* no es útil para la producción de succinato en ausencia de una mutación en fosfoenolpiruvato sintasa (Chao y Liao, 1993; Kim *et al.,* 2004; Gokarn *et al.,* 2000; Millard *et al.,* 1996), han sido construidos por ingeniería KJ017 y derivados para usar fosfoenolpiruvato carboxi cinasa como la ruta primaria para la producción de succinato y malato.

Construcción de KJ032 y KJ060

Durante el crecimiento con glucosa al 10% (p/v), fueron abundantes co-productos no deseados (acetato, formiato y lactato) en fermentaciones con KJ017 (Δ*ldhA*::FRT Δ*adhE*::FRT Δ*ackA*::FRT), a pesar de la supresión de genes que codifican las actividades primarias de lactato deshidrogenasa (*ldhA*) y acetato cinasa (*ackA*) (Tabla 3). La producción de lactato y acetato también podría dar como resultado rendimientos de ATP más altos, una base para la selección basada en el crecimiento (Fig. 1A).

El gen que codifica piruvato-formiato liasa (*pflB*) fue suprimido de KJ017 para eliminar la pérdida de reductor como formiato y un exceso de acetil~CoA, una fuente potencial de acetato. El transportador de formiato aguas arriba (*focA*) en este operón también se suprimió. Como era de esperar, esta cepa suprimida (KJ032) no creció sin acetato, confirmando que esta es la ruta primaria para la producción de acetil~CoA en KJ017 (Fig. 3C). Es bien conocido que la supresión de *pflB* ocasiona auxotrofia de acetato bajo condiciones anaeróbicas (Sawers y Bock, 1988). El crecimiento y la producción de succinato por KJ032 se restauraron agregando acetato 20 mM (Fig. 3C, Fig. 4C, y Fig. 5). La producción de formiato y acetato se redujo sustancialmente como resultado de la supresión de *pflB (y focA)*. Aunque esta cepa requirió acetato para su crecimiento, también se produjo acetato adicional durante la fermentación. Se informó previamente del mismo fenómeno para cepas con *pflB* suprimido durante la construcción de biocatalizadores de *E. coli* K-12 para la producción de piruvato (Causey *et al.,* 2004). Los niveles de lactato también se redujeron en KJ032 (Tabla 3; Fig. 4C). Transferencias subsiguientes fueron acompañadas por mejoras en el crecimiento y producción de succinato. El acetato añadido se redujo, el tamaño del inóculo se redujo, y la concentración de glucosa se duplicó (10% p/v) durante transferencias subsiguientes (Fig. 4D). Después de reducir la cantidad de acetato a 5 mM, emergió una población inestable que produjo niveles elevados de malato a expensas de succinato. Después de más transferencias, se omitió el acetato y se desarrollo una cepa que ya no era auxotrófica para acetato, presumiblemente debido a un incremento de expresión de otro gen. Sin embargo, los rendimientos de succinato declinaron tras la eliminación del acetato añadido, mientras que aumentaron los niveles de malato y acetato. La fuente de acetato y la base del aumento de malato son desconocidas. También se produjo una pequeña cantidad de piruvato. Se aisló un clon de la última transferencia y se designó KJ060 (Δ*ldhA*::FRT Δ*adhE*::FRT Δ*ackA*::FRT Δ*focA-pflB*::FRT). Esta cepa produjo 1 mol de succinato por mol de glucosa metabolizada en medio de sales minerales NBS con 10% de glucosa.

Construcción de KJ070 y KJ071 por supresión de metilglioxal sintasa (mgsA)

Se presume que la pequeña cantidad de lactato presente en los caldos de fermentación de varias cepas se origina de la ruta de metilglioxal sintasa (Fig. 6; Grabar *et al.,* 2006). Aunque esto representa una pequeña pérdida de rendimiento, la producción de lactato por esta ruta es indicativa de acumulación de metilglioxal, un inhibidor tanto de crecimiento como de glicólisis (Egyud y Szent-Gyorgyi, 1966; Grabar *et al.,* 2006; Hopper y Cooper, 1971). La producción de metilglioxal y lactato se eliminó suprimiendo el gen *mgsA* (metilglioxal sintasa) en KJ060 para producir KJ070 (Δ*ldh*A::FRT Δ*adh*E::FRT Δ*ack*A::FRT Δ*focA-pflB*::FRT Δ*mgsA*). La cepa KJ070 inicialmente se subcultivó en glucosa al 5% (p/v) (Fig. 4E y Fig. 5). Se presume que la supresión de *mgsA* tiene un flujo glicolítico incrementado, evidente por la acumulación de piruvato en el medio (Tabla 3). Este aumento en el flujo glicolítico también puede ser responsable de la declinación adicional en la proporción de succinato/malato, debido al incremento de producción de oxaloacetato, un inhibidor alostérico de fumarato reductasa (Iverson *et al.,* 2002; Sanwal, 1970c).

En la transferencia 21, la glucosa se duplicó a 10% (p/v) y continuaron las transferencias. Este nivel más alto de glucosa y transferencias subsiguientes dieron como resultado más incrementos en la producción de malato, rebasando al succinato en las últimas transferencias (Fig. 4E). El incremento de producción de malato en comparación con succinato en glucosa al 10% p/v también es coherente con un incremento del flujo glicolítico e inhibición de fumarato reductasa por oxaloacetato. En la transferencia 50, se produjeron 1,3 moles de malato y 0,71 moles de succinato por mol de glucosa metabolizada (Tabla 3). También se produjeron cantidades significativas de acetato. Se aisló una nueva cepa del subcultivo final y se designó KJ071 (Δ*ldh*A::FRT Δ*adh*E::FRT Δ*ack*A::FRT Δ*focA-pflB*::FRT Δ*mgsA*). Esta cepa puede ser útil para la producción de malato.

Construcción de KJ072 y KJ073 por supresión de poxB

Aunque la conversión de glucosa en acetato es rédox neutra, el reparto de carbono para acetato disminuye el rendimiento de succinato y malato. La piruvato oxidasa (*poxB*) representa una fuente potencial de acetato y CO_2 durante la incubación bajo condiciones microaerófilas (Causey *et al.,* 2004). Aunque no funcionaría para oxidar piruvato bajo condiciones anaeróbicas, *poxB* fue escogido para la supresión del gen (Fig. 6). Como era de esperar, la supresión de *poxB para producir* KJ072 (Δ*ldh*A::FRT Δ*adh*E::FRT Δ*ack*A::FRT Δ*focA-pflB*::FRT Δ*mgsA* Δ*poxB*) no redujo la producción de acetato, indicando que están involucradas rutas alternativas en la producción de acetato. Sin embargo, la eliminación de *poxB* dio como resultado cambios inesperados en los productos de fermentación, un aumento de succinato y una disminución de malato (Tabla 3; Fig. 4F). El mecanismo de esta mejora para la producción de succinato es desconocido, pero puede estar relacionado con otras actividades de piruvato oxidasa, tales como producción de acetoína, descarboxilación y carboligación (AjI y Werkman, 1948; Chang y Cronan, 2000).

La cepa KJ072 se sometió a 40 rondas adicionales de evolución metabólica en medio AM1, un medio con menos sal, con glucosa al 10% (p/v) (Tabla 3; Fig. 4F y Fig. 5). Se observaron mejoras en el crecimiento, rendimiento celular y producción de succinato durante estas transferencias. También aumentaron los niveles de malato, piruvato y acetato. Se aisló un clon de la transferencia final y se designó como KJ073 (Δ*ldh*A::FRT Δ*adh*E::FRT Δ*ack*A::FRT Δ*pflB*::FRT Δ*mgsA* Δ*poxB*). Esta cepa retuvo la ruta de fosfoenolpiruvato carboxi cinasa para la carboxilación (Tabla 4). La actividad *in vitro* de esta cepa fue 45 veces más alta que la de KJ012, y 10 veces más alta que la de KJ017, dando más evidencia del estrecho acoplamiento entre la conservación de energía con producción de succinato y el crecimiento, y estableciendo además la base usada para la selección.

Fermentación de KJ060 y KJ073 en medio AM1 que contiene glucosa al 10% (p/v)

La Figura 7 muestra fermentaciones por lotes con KJ060 y KJ073, los dos mejores biocatalizadores para la producción de succinato. Aunque el crecimiento se completó en el transcurso de las primeras 48 horas de incubación, la producción de succinato continuó durante 96 horas. Un tercio de la producción de succinato ocurrió en ausencia de crecimiento celular. Estas cepas produjeron títulos de succinato de 668-733 mM, con un rendimiento molar de 1,2-1,6 basado en la glucosa metabolizada. Con medio AM1, típicamente los rendimientos fueron más altos que con medios de sales minerales NBS. El acetato, malato y piruvato se acumularon como co-productos indeseables y disminuyeron el rendimiento potencial de succinato (Tabla 3). El rendimiento máximo teórico de succinato a partir de glucosa y CO_2 (exceso) es de 1,71 moles por mol de glucosa, basados en la siguiente ecuación:

$$7\ C_6H_{12}O_6 + 6\ CO_2 \rightarrow 12\ C_4H_6O_4 + 6\ H_2O$$

Sin embargo, no hay ruta directa de succinato en *E. coli* que alcance este rendimiento (Fig. 6).

Conversión de otros sustratos en succinato

Aunque este estudio se centro principalmente en la conversión de glucosa en succinato, es muy conocido que *E. coli* tiene la capacidad nativa para metabolizar todos los azúcares de hexosa y pentosa que son constituyentes de las paredes celulares de las plantas (Asghari *et al.,* 1996; Underwood *et al.,* 2004). Algunas cepas de *E. coli* también pueden metabolizar sacarosa (Moniruzzaman *et al.,* 1997). La cepa KJ073 se probó para evaluar la utilización de 2% de azúcares de hexosas y pentosas en tubos de suero. En todos los casos, estos azúcares fueron convertidos principalmente en succinato. La cepa KJ073 también metabolizó glicerol a succinato. Durante la incubación con glicerol al 2%, se metabolizó glicerol 143 mM para producir succinato 127 mM, con un rendimiento molar de 0,89, 89% del máximo teórico.

Producción de malato en medio NBS que contiene betaína 1 mM y glucosa al 10%

Durante las selecciones basadas en crecimiento, se observaron cultivos que varían en su producción de malato (Tabla 3), un producto alternativo potencialmente útil. El malato fue el producto más abundante de KJ071 con glucosa al 10% (Tabla 3; Fig. 4E), casi el doble que el succinato. Esta cepa produjo malato 516 mM con un rendimiento molar de 1,44 basado en la glucosa metabolizada (Tabla 3).

Conclusiones

El metabolismo fermentativo de *E. coli* ha mostrado ser notablemente adaptable. Se modificaron mediante ingeniería genética derivados y se hicieron evolucionar para evitar muchas supresiones de genes relacionados con las rutas nativas de fermentación y aumentar los flujos a través de las enzimas remanentes para mantener el equilibrio rédox, aumentar la eficiencia de producción de ATP, y aumentar el crecimiento. Aunque mucho más desafiante, las células pueden hacer estos cambios adaptativos en medio de sales minerales, mientras equilibran el reparto de carbono para cubrir todas las necesidades biosintéticas. Después de eliminar las rutas primarias de oxidación de NADH (lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa) y producción de acetato (acetato cinasa), el crecimiento y producción de ATP permanecen conectados a la oxidación de NADH y a la producción de malato o succinato para el equilibrio rédox (Fig. 1B). Las selecciones basadas en el crecimiento anaeróbico aseguran el equilibrio rédox y seleccionan una mayor eficiencia y velocidad de producción de ATP, la base del incremento de crecimiento. Esta selección para equilibrio rédox y producción de ATP no puede distinguir fácilmente entre malato y succinato como productos finales, puesto que los precursores de ambos sirven como aceptores de electrones. Durante estas

investigaciones, se desarrolló una cepa (KJ071), que produce más malato que succinato. Esta cepa y derivados adicionales pueden ser útiles para la producción de malato. Otras cepas tales como KJ073 y KJ060 producen succinato como el producto primario, con rendimientos de 1,2 a 1,6 moles por mol de glucosa.

La supresión de *pflB*, la fuente primaria de acetil~CoA durante crecimiento anaeróbico, dio como resultado un requerimiento auxotrófico para acetato (Sawers y Bock, 1988). Este requerimiento se eliminó por evolución metabólica, debido presumiblemente a un incremento de producción de acetil~CoA por otras rutas, tales como piruvato deshidrogenasa (de Graef *et al.,* 1999). La fuente metabólica del acetato o acetil~CoA que reemplazó esta necesidad auxotrófica es desconocida. Muchas desviaciones de productos metabólicos no eran esperadas. El incremento de malato durante las selecciones después de la supresión de *mgsA* es inexplicable. El metilglioxal es un inhibidor metabólico producido en respuesta a un desequilibrio de metabolismo (Grabar *et al.,* 2006). La eliminación de la producción de metilglioxal puede haber provisto una ventaja relacionada con el crecimiento, tal como un incremento de la velocidad de crecimiento, una demora más corta después de inoculación, etcétera. La reducción de malato y la desviación a una producción de succinato más alta después de la supresión de *poxB* también fueron sorprendentes. Se observó poco cambio en el nivel de acetato, indicando que esta enzima era una fuente menor de acetato o que fue funcionalmente reemplazada por otras rutas para la producción de acetato. Después de la supresión de *poxB,* fue producido nuevamente succinato como el ácido dicarboxílico dominante. Con las mejores cepas para la producción de succinato, KJ060 y KJ073, el malato y el acetato permanecieron como co-productos abundantes (Tabla 3; Figs. 4D y 4F). La eliminación de estas representa una oportunidad adicional para aumentar los rendimientos.

Toda la *E. coli* modificada previamente mediante ingeniería genétiaca para la producción de succinato ha utilizado medio complejo y plásmidos con antibióticos para mantenimiento. La mayoría ha logrado apenas títulos bajos de succinato en fermentaciones por lotes simples, requiriéndose procesos más complejos para alcanzar títulos altos (Tabla 1). Se ha informado sobre una variedad de enfoques genéticos que aumentan la producción de succinato partiendo de glucosa por *E. coli* recombinante en medio complejo. En la construcción inicial de los autores de la presente invención, el crecimiento y el metabolismo de azúcar fueron muy débiles en medio de sales minerales, pero fueron muy fuertes en medio complejo (caldo de Luria). El medio complejo que contiene vitaminas, aminoácidos y otros precursores macromoleculares puede enmascarar potenciales problemas reguladores del metabolismo y biosíntesis, que fueron creados por la ingeniería metabólica.

Muchos otros investigadores también han usado genes heterólogos y procesos complicados que incluyen rociado con gas (CO_2, H_2, O_2 o aire) y pasos de procesos dobles, aeróbicos y anaeróbicos. Sería de esperar que esta complejidad de procesos y nutrientes incrementara el costo de construcción, materiales, purificación y eliminación de desechos. En contraste, las cepas KJ060 y KJ073 produjeron altos títulos de succinato (600-700 mM) en fermentaciones por lotes simples (10% de azúcar) usando medios de sales minerales sin nutrientes complejos ni genes foráneos.

Ejemplo 2

Los microorganismos se depositaron en la Colección de Cultivos ARS de la siguiente manera:

Cultivo	Designación de cepa	Fecha de depósito
KJ073	B-50029	15 de marzo de 2007
KJ091	B-50110	20 de febrero de 2008
KJ098	B-50111	20 de febrero de 2008
KJ104	B-50112	20 de febrero de 2008
KJ110	B-50113	20 de febrero de 2008
KJ119	B-50114	20 de febrero de 2008
KJ122	B-50115	20 de febrero de 2008
KJ134	B-50116	20 de febrero de 2008

Materiales y métodos

Cepas, medios y condiciones de cultivo

Se desarrollaron derivados nuevos de *E. coli* C (ATCC 8739) para la producción de succinato usando una combinación única de supresiones de genes acopladas con selección basada en crecimiento. Las cepas, plásmidos y cebadores usados en este estudio se resumen en la Tabla 1. Durante la construcción de las cepas, los cultivos se desarrollaron a 37°C en caldo modificado de Luria-Bertani (LB) (por litro: 10 g de triptona Difco, 5 g de extracto de levadura Difco, 5 g de cloruro de sodio) (Miller, 1992), y se añadió un suplemento de antibióticos según fuera adecuado (Jantama *et al.,* 2008; Zhang *et al.,* 2007). No estaban presentes genes que codifican resistencia a

antibióticos, plásmidos, ni genes foráneos en las cepas finales desarrolladas para la producción de succinato. Después de la construcción, las cepas se desarrollaron y se mantuvieron en un medio AM1 (Martínez *et al*, 2007). A este medio se le añadió un suplemento de $KHCO_3$ 100 mM y glucosa (como se indica). También se añadió betaína (1 mM) cuando las concentraciones iniciales de glucosa eran de 5% (p/v) o más altas.

Supresión de marcadores FRT en las regiones adhE, ldhA, y focA-pflB

La estrategia usada para hacer supresiones secuenciales de genes y quitar los marcadores FRT de los locus *adhE, ldhA, y focA-pflB* ha sido descrita previamente (Datsenko y Wanner, 2000; Grabar *et al*., 2006; Jantama *et al.,* 2008; Zang *et al.,* 2007). El plásmido pLOI4151 se usó como una fuente de una casete *cat-sacB* y se usó Recombinasa Red (pKD46) para facilitar eventos de recombinación homóloga de cruzamiento doble. Se usó la resistencia al cloranfenicol para seleccionar la integración. El crecimiento con sacarosa se usó para seleccionar la pérdida de *sacB*. Con este enfoque se construyeron supresiones sucesivas para producir derivados de KJ079 que eliminaron todos los sitios FRT. Los cebadores y plásmidos se enumeran en la Tabla 1.

Para quitar el sitio FRT de la región Δ*adh*E, se diseñaron cebadores híbridos (WM*adh*EA/C) para la región objetivo Δ*adh*E::FRT, para contener aproximadamente 50 p.b. de homología con las regiones 5' y 3' del sitio Δ*adh*E::FRT, y 20 p.b. que corresponden al gen *cat-sacB* de pLOI4151. Estos cebadores se usaron para amplificación de PCR de la casete *cat-sacB* usando como molde pLOI4151. El producto de PCR resultante se usó para reemplazar el sitio FRT en la región Δ*adh*E con una casete *cat-sacB* mediante un evento de recombinación homóloga de cruzamiento doble, con selección por resistencia a cloranfenicol, para producir TG200.

El gen *adh*E y la secuencia circundante se amplificaron a partir de *E. coli* C usando los cebadores up/down*adhE*. El producto de PCR que contenía *ych*E*'-adhE-ych*G' (3,44 kb) se clonó en pCR2.1-TOPO, produciendo pLOI4413. Se usó una segunda serie de cebadores (IO-*adhE*up/down) para amplificar el producto inverso con pLOI4413 como molde, y polimerasa *Pfu*, para producir un producto de extremos romos en el cual se suprimió un segmento interno de 2,6 kb de la secuencia de *adhE*. Este producto de PCR inversa fue tratado con cinasa y autoligado, dando como resultado pLOI4419. El producto de PCR amplificado de pLOI4419 (cebadores up/down*adhE*) se usó para reemplazar la casete *cat-sacB* en TG200 con la secuencia cromosómica deseada mediante otro evento doble de recombinación homóloga, con selección de sacarosa para la pérdida de sac*B*. La cepa resultante se designó TG201 (KJ079 con FRT eliminado de la región Δ*adh*E).

Los sitios FRT en las regiones Δ*ldhA* y Δ(*focA-pflB*) se eliminaron de manera análoga a la usada para suprimir el sitio *adh*E::FRT. Series de cebadores adicionales (*ldhA*A/*C* e IO-*ldhA*up/down) usados para eliminar el sitio FRT de Δ*ldhA* se incluyen en la Tabla 1, junto con los plásmidos correspondientes (pLOI4430 y pLOI4432). La cepa TG202 se produjo reemplazando esta región en TG201 por el producto de PCR de pLOI4151 (cebadores WM*ldhA*A/C). El casete *cat-sacB* en TG202 se reemplazó por el producto de PCR de pLOI4432 (cebadores *ldhA*A/C) con selección de sacarosa para la pérdida de *sacB* para producir TG203.

Las series de cebadores (up*focA*/Mid*pflA* e IO-*ycaO*up/IO-mid*pflA*down) y los plásmidos correspondientes (pLOI4415 y pLOI4421) usados para eliminar el sitio FRT en Δ(*focA-pflB*) se incluyen en la Tabla 1. La cepa TG204 se produjo reemplazando esta región de TG203 por el producto de PCR de pLOI4151 (cebadores WM*pflB*A/C). La casete *cat-sacB* de TG204 se reemplazó por el producto de PCR de pLOI4421 (cebadores up*focA*/Mid*pflA*) con selección de sacarosa para la pérdida de *sacB* para producir KJ091. KJ091 es un derivado de KJ073 donde todos los sitios de FRT han sido eliminados de las regiones Δ*adhE,* Δ*ldhA, y* Δ*focA-pflB* del cromosoma.

Construcción de pLOI4162 que contiene una casete cat-sacB para supresiones de gen sin marcador

Para facilitar la supresión secuencial de ADN cromosómico, se construyó el plásmido pLOI4162 (Fig. 1) con una casete *cat-sacB* eliminable y la opción para incluir un segmento de 18 p.b. de ADN sintético con codones de detención en todos los marcos de lectura. Este plásmido está compuesto de secuencias sintéticas y partes de plásmidos pLOI2228 (Martínez-Morales *et al.,* 1999), pLOI2511 (Underwood *et al.,* 2002), y pEL04 (Lee *et al.,* 2001; Thomason *et al.,* 2005). Usando pEL04 como molde, se realizó una PCR inversa con los cebadores JMpEL04F1/R1 para eliminar los sitios *SamI y BamHI* no deseados entre los genes *cat* y *sacB*. El producto amplificado se digirió con *BglII* (dentro de ambos cebadores) y se autoligó para producir pLOI4152. El plásmido pLOI4131 se construyó por ligación del fragmento FRT-cat-FRT (*BanI* tratado con Klenow, *ClaI*) de pLOI2228, en sitios compatibles de pLOI2511 (*NheI* tratado con Klenow, *ClaI*). Subsiguientemente el plásmido pLOI4131 se digirió con *EcoRI* y se autoligó para quitar el fragmento FRT-*cat*-FRT y producir pLOI4145, reteniendo sitios simples *KasI y XmaI.* Se preparó un segmento poliligador (SfPBXPS) recociendo oligonucleótidos complementarios (SfPBXPSsense y SfPBXPScomp). Después de la digestión con *KasI y XmaI,* este segmento se ligó en los sitios correspondientes de pLOI4145 para producir pLOI4153. La casete *cat-sacB* modificada de pLOI4152 se amplificó por PCR usando la serie de cebadores JM*catsacB*up3/down3. Después de digestión con *BamHI y XhoI*, esta casete se ligó en sitios correspondientes de pLOI4153 para producir pLOI4146. Para crear una región de 18 p.b. (5'GCCTAATTAATTAATCCC3') (SEQ ID NO: 1) con codones de detención en los seis marcos de lectura, pLOI4146 se digirió con *PacI* y se autoligó para producir pLOI4154 (no mostrado), quitando la casete *cat-sacB*. Se insertaron dos bases adicionales (T y A) entre los sitios *SfoI y PacI* de pLOI4154 usando cebadores mutagénicos (JM4161sense/comp) y amplificación de plásmido lineal para producir pLOI4161. Finalmente, el fragmento digerido

con *PacI* de pLOI4146 que contiene la casete *cat-sacB* se ligó en el sitio digerido con *PacI* de pLOI4161 para producir pLOI4162 (Núm. de registro GenBank EU531506).

Construcción de supresiones de gen en tdcDE y aspC

El gen *tdcDE* y regiones vecinas de 1000 p.b. de (*tdcG'-tdcFED-tdcC',* 5325 p.b.) se amplificaron usando los cebadores *tdcDE*up/down y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO para producir el plásmido pLOI4515. Una preparación diluida 1000 veces de este ADN plasmídico sirvió como molde para amplificación inversa usando los cebadores *tdcDE*F7/R7 (ambos cebadores dentro del gen *tdcDE* y orientados hacia fuera). El fragmento de 6861 p.b. resultante que contenía el replicón se ligó en la casete *cat-sacB* digerida con S*maI*/*Sfo*I amplificada de pLOI4162 (cebadores JM*catsacB*up3/down3) para producir pLOI4516. Este fragmento de 6861 p.b. también se usó para construir un segundo plásmido, pLOI4517 (tratado con cinasa, autoligación), que contiene una supresión de *tcdD y tdcE*. Los fragmentos de PCR amplificados de pLOI4516 y pLOI4517 (cebadores *tdcDE*up/down) se usaron para reemplazar la región *tdcDE* en KJ091. Los clones resultantes se sometieron a ensayo para determinar la pérdida de resistencia a ampicilina y cloranfenicol y se designaron KJ098.

El gen *aspC* se suprimió de KJ104 de manera análoga a la usada para suprimir el gen *tdcDE*. La serie de cebadores adicionales (*aspCup*/down *y aspC*1/2) usados para construir la supresión de *aspC* se incluyen en la tabla 1, junto con los plásmidos correspondientes (pLOI4280, pLOI4281, y pLOI4282). La cepa resultante se designó KJ110. Ni KJ098 ni KJ110 contienen ninguna secuencia intermedia dentro de las regiones suprimidas respectivas (*tdcDE* y *aspC*).

Eliminación del sitio FRT en la región ackA y construcción de supresiones de los genes citF, sfcA, y pta-ackA

Para eliminar el sitio de FRT de la región *ackA* de KJ073, se construyeron plásmidos que contienen secuencias de la mutación deseada, de la siguiente manera. Se usó ADN genómico de *E. coli* C como molde para la amplificación de PCR de *ackA* con los cebadores JM*ackAF1*/R1 que se unen aproximadamente 200 p.b. aguas arriba y aguas abajo del gen *ackA*. El producto lineal se clonó en pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California) para producir pLOI4158. El plásmido pLOI4158 se usó después como molde para la PCR inversa con los cebadores JM*ackAup*1/down1 y *Pfu* polimerasa para producir un producto de extremos romos que carece de un segmento interno de 808 p.b. de *ackA*. La casete *cat-sacB* flanqueada por *Pac*I (fragmento *SmaI/Sfo*I de pLOI4162*)* se ligó después en el producto romo de la PCR para producir pLOI4159. El plásmido pLOI4159 sirvió como molde para la amplificación de PCR (cebadores JM*ackA*F1/R1). Este producto de PCR se usó para reemplazar el sitio FRT en la región *ackA* de KJ073 por recombinación homóloga de cruzamiento doble, con selección por resistencia a cloranfenicol. El clon resultante se designó KJ076.

El plásmido pLOI4159 también se digirió con *Pac*I para eliminar la casete *cat-sacB* y se autoligó para producir pLOI4160, reteniendo la secuencia de detención de traducción de 18 p.b. El plásmido pLOI4160 sirvió como molde para PCR (cebadores JM*ackA*F1/R1). Este fragmento amplificado se usó para reemplazar la casete *cat-sacB* en KJ076 por recombinación homóloga de cruzamiento doble con selección por la pérdida de *sacB*. Después de la eliminación de pKD46 por crecimiento a temperatura elevada, la cepa resultante se designó KJ079. En esta cepa, la región suprimida ha sido reemplazada por la secuencia de detención de traducción de 18 p.b.

La estrategia usada arriba para eliminar el sitio FRT de la región *ackA* se utilizó para hacer supresiones secuenciales de *citF, sfcA, y pta-ackA*, y para reemplazar las regiones suprimidas con la secuencia de detención de traducción de 18 p.b. Las series de cebadores adicionales (*citFup/down y citF2/3*) usadas para construir la supresión de *citF* se incluyen en la Tabla 1, junto con los plásmidos correspondientes (pLOI4629, pLOI4630 y pLOI4631). La cepa resultante se designó KJ104.

El gen *sfcA* se suprimió de las cepas KJ104 y KJ110, dando como resultado las cepas designadas KJ119 y KJ122, respectivamente. Las series de cebadores adicionales (*sfcAup/*down y *sfcA*1/2*)* usados para construir las supresiones de *sfcA* se incluyen en la Tabla 1, junto con los plásmidos correspondientes (pLOI4283, pLOI4284 y pLOI4285).

El operón *ackA-pta* (que incluye la secuencia de detención de traducción sintética) se suprimió de KJ122 para producir la cepa KJ134. Las series de cebadores adicionales (*ackAup/pta*down y *ackA2/pta2)* usados para construir esta supresión se incluyen en la Tabla 1, junto con los plásmidos correspondientes (pLOI4710, pLOI4711 y pLOI4712). La cepa KJ134 no contiene ningún sitio FRT ni genes foráneos.

Fermentaciones

Se incubaron a 37°C (100 rpm) cultivos de siembra y fermentaciones en medio de sales minerales AM1 (Martínez *et al*, 2007) que contienían glucosa al 10% (p/v) (555 mM), $KHCO_3$ 100 mM, y betaína HCl 1 mM. Una mezcla de K_2CO_3 3M y KOH 6N se añadió para mantener el pH y suministrar CO_2. Diferencias en la composición de base (mezclas 1:1, 4:1, 6:1) tuvieron poco efecto sobre la fermentación. Las fermentaciones se efectuaron en pequeños recipientes con un volumen de trabajo de 350 ml. Las fermentaciones se inocularon a una DO_{550} inicial de 0,01 (3,3 mg de peso seco celular l^{-1}), a menos que se indique de otra manera. Los recipientes de fermentación se sellaron

excepto por una aguja de calibre 16 que sirvió como ventilación y orificio para retirar la muestra. La anaerobiosis se alcanzó rápidamente durante el crecimiento. El bicarbonato añadido sirvió para asegurar una atmósfera de CO_2.

Análisis

La masa celular se estimó de la densidad óptica a 550 nm (DO 1,0 = 333 mg de peso seco celular l^{-1}), usando un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 70. Los ácidos orgánicos y los azúcares se determinaron usando cromatografía de líquida de alta resolución (Grabar *et al*, 2006).

Resultados y discusión

Construcción de cepas sin marcador para la producción de succinato

Los genes centrales de la fermentación anaeróbica de *E. coli* C de tipo salvaje se suprimieron secuencialmente mediante la estrategia de Datsenko y Wanner (2000) con productos de PCR y marcadores de antibiótico eliminables (usando sitios de reconocimiento de FRT y recombinasa FLP). Estas construcciones, en combinación con evolución metabólica (selección basada en crecimiento por incremento de eficiencia en la producción de ATP), se usaron para seleccionar una cepa mutante que reclutó la fosfoenolpiruvato carboxi cinasa (*pck*) conservadora de energía, para aumentar el crecimiento y la producción de succinato (Fig. 9). La cepa resultante, KJ073, produjo 1,2 moles de succinato por mol de glucosa metabolizada (Jantama *et al*., 2008) y ahora utiliza una ruta de succinato muy análoga a la bacteria del rumen, *Actinobacillus succinogenes* (van der Werf *et al*, 1997) y *Mannheimia succiniciproducens* (Song *et al*, 2007). Sin embargo, los métodos usados para construir estas supresiones de gen dejan una cicatriz genética sola de 82 a 85 nt o sitio FRT en la región de cada gen suprimido (*ackA, ldhA, adhE, ackA, focA-pflB*). Estos sitios FRT sirvieron como sitios de reconocimiento para la recombinasa FLP (Storici *et al.*, 1999) durante la eliminación de los genes de antibiótico. Todas estas secuencias extrañas se quitaron secuencialmente de KJ073 y se reemplazaron por ADN nativo, con solo la supresión del gen deseado, usando métodos que han sido descritos previamente (Grabar *et al*, 2006; Zhang *et al*, 2007; Jantama *et al*, 2008). La cepa resultante, KJ091, contiene supresiones específicas en *ackA, ldhA, adhE, focA-pflB, ackA, mgsA, y poxB,* y carece de todos los sitios FRT. Esta cepa carece de todo ADN foráneo y sintético, excepto por una secuencia de detención de traducción de 18 p.b. dentro de *ackA*. La producción de succinato por la cepa KJ091 fue equivalente a la de KJ073 (Tabla 7). Esta cepa se usó como el progenitor para mejoras ulteriores en la producción de succinato.

Reducción de acetato durante la producción de succinato por supresión de tdcD y tdcE

Durante la fermentación anaeróbica de glucosa por *E. coli*, la piruvato formiato-liasa (*pflB*) sirve como la fuente primaria de acetil~CoA, el precursor de acetil~P, y la acetato cinasa (*ackA)* sirve como la ruta primaria para la producción de acetato a partir de acetil~P (Karp *et al*, 2007; Kessler & Knappe, 1996). La abundancia de acetato como un producto de fermentación en las cepas KJ073 y KJ091 fue sorprendente puesto que estas cepas contienen supresiones tanto en *ackA* como en *pflB* (Fig. 9). Este acetato residual al final de la fermentación representa una oportunidad esencial para redirigir más el metabolismo para mejorar el rendimiento de succinato.

Una enzima relacionada con la actividad de acetato cinasa (y propionato cinasa) es codificada por *tdcD,* pero típicamente es producida solo por la degradación de treonina (Hesslinger *et al,* 1998; Reed *et al,* 2003). Es posible que las mutaciones que ocurren durante la selección tengan un incremento de la expresión de *tdcD,* como se ilustra en la Fig. 10. Durante el crecimiento anaeróbico con glucosa al 10% (p/v), la expresión de *tdcD* podría reemplazar funcionalmente a *ackA,* aumentando la producción de acetato a partir de acetil~P. El gen *tdcE* adyacente en el mismo operón es similar a *pflB* y codifica una actividad de piruvato (y α-cetobutirato) formiato liasa que es coexpresada durante la degradación de treonina (Hesslinger *et al,* 1998). Es posible que el incremento de la expresión de este gen durante el crecimiento anaeróbico con glucosa al 10% (p/v) pueda aumentar la producción de acetil~CoA, el intermedio precursor de acetil~P, y consuma reductor como formiato (Fig. 10). Tanto *tdcD* como *tdcE* (adyacente) se suprimieron simultáneamente de KJ091 para producir KJ098. La supresión de estos dos genes redujo a la mitad la producción de acetato y aumentó 10% el rendimiento de succinato en KJ098 en comparación con KJ091, estableciendo la importancia de esta ruta inesperada para desviar el flujo de carbono del succinato. Sorprendentemente, la producción de malato por KJ091 también fue eliminada como resultado de las nuevas supresiones en KJ098. El nivel de piruvato producido por KJ098 también disminuyó 40%, un intermedio que se esperaría que aumentara por eliminación de dos rutas alternativas para el metabolismo de piruvato, la actividad de piruvato formiato liasa (*tdcD)* y la actividad de acetato cinasa (*tdcE).* Los mecanismos responsables de la eliminación de malato (un contaminante problemático durante la purificación de succinato), la reducción de piruvato, y el aumento de succinato, que resultaron de la supresión simultánea de *tdcD y tdcE*, son desconocidos.

Efecto de la supresión de citrato liasa (citDEF) sobre el rendimiento de acetato durante la producción de succinato

Aunque KJ098 representa una mejora significativa sobre KJ091, puede ser posible una mayor reducción de los niveles de acetato y más incrementos en los rendimientos de succinato. Bajo condiciones anaeróbicas, el oxaloacetato es dividido en el producto reducido (malato) y el intermedio oxidado (citrato) (Fig. 9). El citrato se puede convertir de nuevo en oxoloacetato y acetato por medio de citrato liasa (*citDEF*) para reciclar la reserva intracelular de OAA para otras funciones metabólicas (Nilekani *et al,* 1983). La expresión de cantidades significativas de citrato liasa está asociada con crecimiento sobre citrato (Lutgens y Gottschalk, 1980; Kulla y Gottschalk, 1977). La citrato

liasa es un complejo multienzimático hecho de tres cadenas de polipéptido diferentes. La subunidad α o grande es una citrato-ACP transferasa que cataliza el primer paso. La subunidad β o media es una citril-ACP liasa que cataliza el segundo paso. La subunidad γ o pequeña actúa como una proteína portadora de acilo y también lleva los componentes del grupo prostético. Las tres unidades se requieren para que ocurra la reacción (Quentmeier *et al,* 1987). La supresión de genes que codifican una o más de estas subunidades eliminaría la actividad de citrato liasa y disminuiría más el nivel de acetato durante la producción de succinato. El gen *citF* se suprimió de KJ098 para producir KJ104. Sin embargo, esta supresión no tuvo efecto sobre la producción de acetato ni otro rendimiento de succinato (Tabla 7). Puesto que la supresión de *citF* no ocasiona ninguna reducción de acetato, se presume que este intermedio se origina de otras rutas. Por razones desconocidas, la supresión de *citF* afectó adversamente al crecimiento de KJ104 (rendimiento celular reducido en 22%), y aumentó el nivel de piruvato al final de la fermentación casi en 50% en comparación con KJ098. Sin embargo, el rendimiento de succinato, título, productividad promedio y niveles de acetato con KJ104, fueron comparables a los de KJ098 (Tabla 7).

Efectos de las supresiones de aspC y sfcA sobre el rendimiento de succinato

La aspartato aminotransferasa (*aspC*) es una enzima multifuncional que cataliza la síntesis de aspartato, fenilalanina y otros compuestos por transaminación. En la reacción, el L-aspartato es sintetizado de oxaloacetato, un intermedio de la carboxilación de PEP, mediante una reacción de transaminación con L-glutamato. El aspartato es un constituyente de proteínas y participa en otras diversas rutas biosintéticas. Se ha estimado que aproximadamente 27% del nitrógeno celular fluye a través de aspartato (Reitzer, 2004). La biosíntesis de aspartato y la producción de succinato comparten una reserva intracelular común de oxoloacetato. La supresión de *aspC* puede aumentar la producción de succinato pero también puede crear requerimientos auxotróficos que impiden el crecimiento anaeróbico en medio de sales mínimo, tal como AM1.

Este gen de aspartato aminotransferasa (*aspC)* fue suprimido de KJ104 para producir KJ110. Inesperadamente, la supresión de *aspC* no tuvo efecto sobre el rendimiento de succinato ni el rendimiento celular en KJ110, en comparación con KJ104 (Tabla 7). De esta manera, parece que la aspartasa no desvía niveles significativos de oxaloacetato de la producción de succinato en la cepa de los autores de la presente invención. Parecen estar disponibles enzimas alternativas que reemplazan las necesidades biosintéticas catalizadas antes por aspartato aminotransferasa.

Cantidades significativas de piruvato están presentes al final de la fermentación con KJ104 y otras cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para la producción de succinato (Tabla 7). Este piruvato representa un producto no deseado y una oportunidad adicional de aumentar el rendimiento de succinato. Este nivel alto de piruvato en el caldo de fermentación resultaría de la descarboxilación de malato a piruvato por medio de la enzima málica (*sfcA*), como se ilustra en la Fig. 10. Se piensa que esta enzima funciona principalmente durante la gluconeogénesis (Unden y Kleefeld, 2004; Stols y Donnelly, 1997; Oh *et al,* 2002), más que durante el catabolismo anaeróbico de la glucosa. Aunque la carboxilación reductiva de piruvato para formar malato es favorecida termodinámicamente, los parámetros cinéticos de esta enzima favorecen la deshidrogenación y la descarboxilación bajo condiciones fisiológicas (Stols y Donnelly, 1997). La expresion en exceso de esta enzima para carboxilar piruvato se ha usado previamente como una base para construir cepas de *E. coli* para la producción de succinato (Stols y Donnelly 1997).

Si la enzima málica (*sfcA*) es carboxilante en KJ104 (y cepas relacionadas) y contribuye a la producción de succinato, se esperaría que la supresión de este gen redujera los rendimientos de succinato y aumentara los niveles de otros productos como piruvato. Alternativamente, si la enzima málica (*sfcA*) es descarboxilante en KJ104 y desvía malato a piruvato, sería de esperar que la supresión del gen que codifica esta enzima aumentara los rendimientos de succinato y disminuyera los niveles de piruvato. Inesperadamente, la supresión del gen *sfcA* de KJ104 para producir KJ119, no tuvo efecto mensurable sobre la producción de succinato, el crecimiento, los niveles de piruvato, etcétera (Tabla 7), en comparación con KJ104. Estos resultados muestran claramente que la enzima málica (*sfcA)* no es importante para la producción de succinato en KJ104 y cepas relacionadas. Este resultado contrasta notablemente con las cepas productoras de succinato desarrolladas por Stols *et al*. (1997), en las cuales se usó el incremento de producción de enzima málica como la ruta primaria para la producción de succinato.

Aunque no se observaron beneficios significativos ni de la supresión de *sfcA* ni de la supresión de *aspC* en KJ104, se hicieron estudios para probar el efecto de la supresión de ambos genes combinados. Esto se hizo suprimiendo el gen *sfcA* en KJ110 para producir KJ122, y se espera no ver ningún beneficio. Sin embargo, la supresión combinada tanto de *sfcA* como *aspC* (cepa KJ122) dio como resultado un aumento inesperado en el rendimiento y el título de succinato, con una reducción pequeña de acetato (Tabla 7), en comparación con la cepa progenitora KJ110 y las cepas relacionadas (KJ104 y KJ119). La supresión combinada (*aspC* y *sfcA)* en KJ122 dio como resultado aumentos significativos en el rendimiento de succinato, título de succinato y productividad promedio, de 18%, 24% y 24%, respectivamente, en comparación con KJ104. Aunque el mecanismo es desconocido, es posible que las mutaciones individuales sean ineficaces porque son compensadas en parte por un incremento de flujo a través de la actividad remanente, la enzima málica o aspartato aminotransferasa (Fig. 10), impidiendo cualquier beneficio potencial. Se presume que el incremento en el rendimiento y el título de succinato resultan de un incremento en la disponibilidad de oxoloacetato, que permite que una fracción más grande prosiga a succinato. Los niveles de malato también permanecieron muy bajos.

La cepa KJ122 (Tabla 7) produjo 1,5 moles de succinato por mol de glucosa, 88% del rendimiento teórico máximo (1,71 moles por mol de glucosa). Para producir este nivel alto de succinato y reducir completamente el malato, se requirió reductor adicional. Aunque la fuente de este reductor adicional es desconocida, estos resultados son coherentes con un aumento en el flujo de piruvato por medio de piruvato deshidrogenasa. Se piensa que esta enzima funciona principalmente durante el metabolismo aeróbico (Guest *et al,* 1989), pero también se ha informado de que funciona a bajos niveles durante la fermentación (de Graef *et al,* 1999).

Reducción en piruvato y acetato por supresión de pta

KJ122 produjo excelentes rendimientos de succinato (1,5 moles mol^{-1} de glucosa) más cantidades menores de acetato y piruvato. El rendimiento máximo teórico para succinato es 1,71 moles mol^{-1} de glucosa, y estos intermedios de tres carbonos representan una oportunidad de aumentar más el rendimiento. Se presume que el piruvato se acumula de la glicólisis como un sobreflujo metabólico y puede estar relacionado con la acumulación de acetato. La acetil~CoA es un regulador alostérico de muchas enzimas. La fuente de acetato y la actividad de acetato cinasa son desconocidas puesto que los genes que codifican las dos actividades primarias para acetato cinasa (*tdcD* y *ackA*) han sido suprimidos (Fig. 9 y Fig. 10). Suponiendo que el acetato es producido a partir de acetil~P, el producto de fosfotransacetilasa, se construyó una supresión adicional en KJ122 para desactivar el gen *pta*. La cepa resultante, KJ134, produjo el nivel casi teórico de succinato (Tabla 7). En esta cepa, los niveles de piruvato y acetato se redujeron sustancialmente. La productividad volumétrica también se redujo en 17%. Los rendimientos de succinato con la cepa KJ134 son iguales o mejores que todas las otras cepas a pesar de la complejidad de los procesos de fermentación, medios o condiciones de crecimiento.

TABLA 1 Comparación de la producción de succinato por medio de biocatalizadores microbianos[a]

Organismo	Medio/Condición	Título de succinato (mM)[b]	Rendimiento de succinato (mol/mol)	Referencia
E. coli KJ060 (*ldhA adhE ackA focA pftB*)	100 g/l de glucosa AM1 con 10 g/l de $NaHCO_3$, fermentación de lote simple, 120 h de incubación, pH mantenido con mezcla 1:1 de KOH 6M + K_2CO_3 3M	733 [0,90]	1,41	Este documento
E. coli KJ073 (*ldhA adhE ackA focA pftB mgsA poxB*)	100 g/l de glucosa AM1 con 10 g/l de $NaHCO_3$, fermentación de lote simple, 96 h de incubación, pH mantenido con mezcla 1:1 de KOH 6M + K_2CO_3 3M	668 [0,82]	1,20	Este documento
E. coli KJ060 (*ldhA adhE ackA focA pftB*) inóculo alto (200 mg de peso seco celular l^{-1})	100 g/l de glucosa AM1 con 10 g/l de $NaHCO_3$, fermentación de lote simple, 120 h de incubación, pH mantenido con mezcla 1:1 de KOH 6M + K_2CO_3 3M	622 [0,61]	1,61	Este documento
Actinobacillus succinogenes FZ53	130 g/l de glucosa con un suplemento de 15 g/l de l.m.m, y 5 g/l de ext. lev., 80 g/l de $MgCO_3$, fermentación anaeróbica por lote, 78 h de incubación	898 [1,36]	1,25	Guettler et al., 1996a
E. coli AFP111 (*pflAB, ldhA, ptsG*) *pyc* de *Rhizobium etli* expresado en exceso	40 g/l de glucosa (90 g de glucosa total) en medio con un suplemento de 20 g/l de triptona, 10 g/l de ext. lev. y 40 g/l de $MgCO_3$, fermentación por lote de alimentación de fase doble, 76 h de incubación	841 [1,31]	1,68	Vemuri et al., 2002ab
Anaerobiospirillum succiniciproducens ATCC 53488	120 g/l de glucosa en medio basado en peptona/ext. lev., biorreactor de membrana-electrodiálisis integrados con rociado de CO_2, 150 h de incubación	703 [0,55]	1,35	Meynial-Salles et al., 2007
Actinobacillus succinogenes 130Z	100 g/l de glucosa con un suplemento de 15 g/l de lmm y ext. lev., 80 g/l de $MgCO_3$, fermentación anaeróbica por lote, rociado de CO_2, 39 h de incubación	678 [2,05]	1,37	Guettler et al., 1996b
E. coli HL27659k/pKK313 (*iclR sdhAB ackA-pta poxB, pstG*) *pepc* de *Sorghum vulgare* expresado en exceso	106 g/l de glucosa en medio con un suplemento de 20 g/l de triptona, 32 g/l de ext. lev. y 2 g/l de $NaHCO_3$, fermentación por lote con alimentación bajo condiciones aeróbicas completas, 59 h de incubación	499 [1,00]	0,85	Lin et al., 2005d

Organismo	Medio/Condición	Título de succinato (mM)[b]	Rendimiento de succinato (mol/mol)	Referencia
Anaerobiospirillum succiniproducens ATCC 53488	50 g/l de glucosa y 10 g/l de lmm, rociado de CO_2 y Na_2CO_3 300 mM, fermentación por lote, 24 h de incubación	426 [2,09]	1,37	Glassner y Datta, 1992
Mannheimia succiniciproducens (*ldhA pflB pta-ackA*)	63 g/L de glucosa en MMH3 (medio basado en extracto de levadura), fermentación por lote con alimentación, 0,25 vol/vol/min, rociado de CO_2, 30 h de incubación	444 [1,75]	1,16	Lee et al., 2006
Aislado bacteriano 130Z ATCC 55618	50 g/l de glucosa con un suplemento de 1% de lmm, 0,6% de ext. lev. y 2 g/l de $MgCO_3$ neutralizado con NaOH 10 N, 0,3 atm de CO_2, 29,5 h de incubación	388 [1,55]	1,40	Guettler et al., 1998
E. coli SBS550MG (*ldhA adhE iclR ackA-pta*), *pyc* de *L. lactis, citZ* de *Bacillus subtillis*	20 g/l de glucosa (100 g de glucosa total) LB con un suplemento de 1 g/l de $NaHCO_3$, 200 mg/l de ampicilina e IPTG 1 mM, 100% de CO_2 a 1L/min, fermentación por lote de alimentación repetida, espacio superior a T y P estándar, 95 h de incubación	339 [0,42]	1,61[c]	Sánchez et al., 2005a; Cox et al., 2006
E. coli AFP184 (*pflB ldhA pts*)	102 g/l de glucosa con un suplemento de 15 g/l de lmm, producción anaeróbica y crecimiento aeróbico en fase doble, rociando con aire, seguido por CO_2, 32 h de incubación	339 [1,27]	0,72[c]	Andersson et al., 2007
Actinobacillus succinogenes ATCC 55618	70 g/l de glucosa con hidrolizado de harina y 5 g/l de ext. lev., fermentación anaeróbica por lote con 4% de inóculo, 65 h de incubación	302 [0,55]	1,18	Du et al., 2007
Anaerobiospirillum succiniciproducens ATCC 53488	50 g/l de glucosa, 2% de lmm y 25 ppm de triptófano, neutralizado con $NaCO_3$ 5,5 M, medio saturado de 0,3 atm de presión parcial de CO_2, 29,5 h de incubación	289 [1,16]	1,04	Guettler et al., 1998
Succinivibrio dextrinosolvens ATCC 19716	15 g/l de lmm y de ext. lev., 100 g/l de glucosa y 80 g/l de $MgCO_3$, fermentación por lote, 36 h,	226 [0,74]	NR	Guettler et al., 1998
Corynebacterium glutanicum R	40 g/l de glucosa (121 g de glucosa total) en medio de sales minerales definido, con $NaHCO_3$ 400 mM, fermentación por lote con alimentación, 6 h de incubación	195 [3,83]	0,29	Okino et al., 2005
Prevotella ruminocola ATCC 19188	15 g/l de lmm y de ext. lev., 100 g/l de glucosa y 80 g/l de $MgCO_3$, fermentación por lote, 36 h de incubación	160 [0,52]	NR	Gettler et al., 1998
E. coli SBS550MG (*ldhA adhE iclR ackA-pta*), *pyc* de *L. lactis, citZ* de *Bacillus subtillis*	20 g/l de LB glucosa con un suplemento de 1 g/l de $NaHCO_3$, 200 mg/l de ampicilina e IPTG 1 mM 100% de CO_2, a 1L/min, espacio superior a T y P estándar, fermentación por lote, 24 h de incubación	162,6 [0,80]	1,61[c]	Sánchez et al., 2005a; Cox et al., 2006
Mannheimia succiniciproducens MBEL55E KCTC 0769BP	18 g/L de glucosa en MH4 (medio basado en ext. lev.) con un suplemento de $NaHCO_3$ 119 mM, un reactor de membrana con reciclado celular continuo, con presión parcial de CO_2 de 101,3 kPa de gas (100% de CO_2), 6 h de incubación	144 [2,83]	1,44	Song et al., 2007
E. coli SBS110MG (*ldhA adhE*), *pyc de Lactococcus lactis*	20 g/l de LB glucosa con un suplemento de 1,5 g/l de $NaHCO_3$ y 0,5 g de $MgCO_3$, 200 mg/l de ampicilina e IPTG 1 mM, fase doble con 100% de CO_2 a 1L/min, espacio superior a T y P estándar, 168 h de incubación	130 [0,09]	1,24[c]	Sánchez et al., 2005a; Sánchez et al., 2006

Organismo	Medio/Condición	Título de succinato (mM)[b]	Rendimiento de succinato (mol/mol)	Referencia
E. coli NZN111 (W1485 *pflB ldhA*), *sfcA* de *E. coli* expresado en exceso	20 g/l de LB glucosa con un suplemento de 0,5 g de $MgCO_3$, 1,5 g/l de NaOAc, 0,1 g/l de ampicilina e IPTG 10 µM, 44 h de incubación, tubo de suero sellado,	108 [0,22]	0,98[c]	Stols et al., 1997
E. coli JCL1208, *ppc* de *E. coli* expresado en exceso	11 g/l de LB glucosa con un suplemento de 0,15 g de $MgCO_3$, 0,1 g/l de carbenicilina e IPTG 0,1 mM, 44 h de incubación, carga de CO_2 anóxico a 1 atm en espacio superior, 18 h de incubación	91 [0,60]	0,44[c]	Millard et al., 1996
E. coli GJT- *pepC* de *Sorghum*	40 g/l de LB glucosa con un suplemento de 27,78 g/l de $MgCO_3$, fermentación por lote simple en matraz sellado hermético al aire	80 [sin datos]	0,42[c]	Lin et al., 2005c
E. coli HL51276k (*iclR icd sdhAB ackA-pta-poxB, pstG*), *pepC* de *Sorghum sp.* Mutación S8D	10,8 g/l de LB glucosa con un suplemento de 2 g/l de $NaHCO_3$, 50 mg/l de kanamicina, IPTG 1 mM, reactor aeróbico por lote, 50 h de incubación	68 [0,16]	1,09[c]	Lin et al., 2005b
E. coli SBS880MG (*ldhA adhE ΔfdhF*), *pyc* de *L. lactis*	20 g/l de LB glucosa con un suplemento de 1,5 g/l de $NaHCO_3$ y 0,5 g de $MgCO_3$, 200 mg/l de ampicilina e IPTG 1mM, Fase doble con 100% de CO_2 en espacio superior, 168 h de incubación	60 [0,04]	0,94[c]	Sánchez et al., 2005b

[a] Abreviaturas: LMM, licor de maceración de maíz; EL, extracto de levadura; NR, no referido.

[b] La productividad volumétrica promedio se muestra entre corchetes [g l^{-1} h^{-1}] por debajo del título de succinato.

[c] El rendimiento molar se calculó basándose en la producción de succinato a partir de azúcar metabolizado durante las condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. La biomasa se generó predominantemente durante el crecimiento aeróbico. El succinato se produjo principalmente durante la incubación anaeróbica con CO_2, H_2, o una mezcla de ambos.

TABLA 2

Cepas de *Escherichia coli*, plásmidos y cebadores usados en este estudio

Cepas de Escherichia coli		
Características Relevantes		Fuentes
Cepa C	Tipo salvaje (ATCC 8739)	ATCC
KJ012	Cepa C, *ΔldhA*::FRT *ΔadhE*::FRT *ΔackA*::FRT	Este estudio
KJ017	KJ012, cepa mejorada seleccionada de glucosa al 10%, NBS	Este estudio
KJ032	KJ017, *ΔldhA*::FRT *ΔadhE*::FRT *ΔackA*::FRT *Δ(focA-pftB)*::FRT	Este estudio
KJ060	KJ032, cepa mejorada seleccionada de glucosa al 10% sin acetato inicial, NBS	Este estudio
KJ070	KJ060, *ΔmgsA*	Este estudio
KJ071	KJ070, cepa mejorada seleccionada de glucosa al 10%, NBS	Este estudio
KJ072	KJ071, *ΔpoxB*	Este estudio
KJ073	KJ072, cepa mejorada seleccionada de glucosa al 10%, AM1	Este estudio
SZ204	*Δ(FocA-pflB)*::FRT-*kan*-FRT	Zhou, 2003

Cepas de Escherichia coli		
Plásmidos		
pKD4	*Bla* FRT-*kan*-FRT	Datsenko, 2000
pKD46	*bla* γ *β exo* (recombinasa Red), replicón condicional de temperatura	Datsenko, 2000
pFT-A	*bla flp* replicón condicional de temperatura y recombinasa FLP	Posfai, 1997
pEL04	casete de dirección *cat-sacB*	Lee, 2001 Thomason 2005
pLOI3421	fragmento *SmaI* de 1,8 kpb que contiene *aac*	Wood, 2005
pLOI4151	casete *bla cat; cat-sacB*	Este estudio
pCR2.1-TOPO	*bla kan*; vector de clonación TOPO TA	Invitrogen
pLOI4228	*bla kan; yccT'-mgsA-helD'* (PCR) de *E. coli* C clonada en el vector pCR2.1-TOPO	Este estudio
pLOI4229	casete *cat-sacB* amplificada por PCR de pLOI4151 (digerido con *EcoRV*) clonado en *mgsA* en pLOI4228	Este estudio
pLOI4230	Fragmento amplificado por PCR de pLOI4228 (usando cebadores *mgsA*-1/2), tratado con cinasa, después autoligación	Este estudio
pLOI4274	*Bla kan; poxB* (PCR) de *E. coli* C clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Este estudio
pLOI4275	casete *Cat-sacB* amplificada por PCR de pLOI4151 (digerido con *EcoRV*) clonado en *poxB* de pLOI4274	Este estudio
pLOI4276	Fragmento amplificado por PCR de pLOI4274 (usando cebadores *poxB*-1/2), tratado con cinasa, después autoligación	Este estudio
ldhA	5' **ATGAACTCGCCGTTTTATAGCACAAAACAGTACG ACAAGAAGTAC**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC3' (SEQ ID NO:2) 5' **TTAAACCAGTTCGTTCGGGCAGGTTTCGCCTTTT TCCAGATTGCT**CATATGAATATCCTCCTTAG3' (SEQ ID NO:3)	Este estudio
adhE	5' **ATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACTTAACGCAC TCGTAGAGCGT**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC3' (SEQ ID NO:4) 5' **TTAGCGGATTTTTTCGCTTTTTTCTCAGCTTTAG CCGGAGCAGC**CATATGAATATCCTCCTTAG3' (SEQ ID NO:5)	Zhou, 2003
ackA	5'**ATGTCGAGTAAGTTAGTACTGGTTCTGAACTGCG GTAGTTCTTCA**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC3' (SEQ ID NO:6) 5'**TCAGGCAGTCAGGCGGCTCGCGTCTTGCGCGATA ACCAGTTCTTC**CATATGAATATCCTCCTTAG3' (SEQ ID NO:7)	Zhou, 2003
focA-pflB	5'**TTACTCCGTATTTGCATAAAAACCATGCGAGTTA CGGGCCTATAA**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC3' (SEQ ID NO: 8) 5'**ATAGATTGAGTGAAGGTACGAGTAATAACGTCCT GCTGCTGTTCT**CATATGAATATCCTCCTTAG3' (SEQ ID NO: 9)	Este estudio
JM*catsacB*	5'**TTAGCTAGCATGTGACGGAAGATCACTTCG**3' (SEQ ID NO: 10) 5'**CCGCTAGCATCAAAGGGAAAACTGTCCATAT**3' (SEQ ID NO:11)	Este estudio
cat-	5'**AGAGAGGATATCTGTGACGGAAGATCACTTCG**3' (SEQ ID NO:12)	Este estudio

Cepas de Escherichia coli		
up2/*sacB*-down2	5'**AGAGAGGATATCGAATTGATCCGGTGGATGAC**3' (SEQ ID NO:13)	
mgsA-up/down	5'**CAGCTCATCAACCAGGTCAA**3' (SEQ ID NO: 14) 5'**AAAAGCCGTCACGTTATTGG**3' (SEQ ID NO: 15)	Este estudio
mgsA-1/2	5'**AGCGTTATCTCGCGGACCGT**3' (SEQ ID NO: 16) 5'**AAGTGCGAGTCGTCAGTTCC**3' (SEQ ID NO: 17)	Este estudio
poxB-up/down	5'**AAGCAATAACGTTCCGGTTG**3' (SEQ ID NO: 18) 5'**CCACTTTATCCAGCGGTAGC**3' (SEQ ID NO: 19)	Este estudio
poxB-1/2	5'**GACGCGGTGATGAAGTGAT**3' (SEQ ID NO: 20) 5'**TTTGGCGATATAAGCTGCAA**3' (SEQ ID NO: 21)	Este estudio
pck-F/R	5'**TTGGCTAAGG AGCAGTGAAA TGCGCGTTA**3' (SEQ ID NO: 22) 5'**CACGACAAAA GAAGGGTAAA TAAAC**3' (SEQ ID NO: 23)	Este estudio
pck-2/3	5'**TTGTTAACGCGCATTTCACT**3' (SEQ ID NO: 24) 5'**GCGATAGCGGCTACTGTCAT**3' (SEQ ID NO: 25)	Este estudio
pck (RT-PCR)	5'**GACGATACCACTCGCGAT**3' (SEQ ID NO: 26) 5'**GTCGACAACGAACAGACGT**3' (SEQ ID NO: 27)	Este estudio
birA (RT-PCR)	5'**ATCGTGATGGCGGAAGT**3' (SEQ ID NO: 28) 5'**CTTGCGATCCTGCAGATAG**3' (SEQ ID NO: 29)	Este estudio

TABLA 3

Fermentación de glucosa en medio de sales minerales por cepas mutantes de *E. coli*

Cepa[a]	Condiciones de cultivo	Medio, Gluc (p/v)	Rend, celular[b] (g/L)	Rend, de succinato[c]		Prod, vol, prom,[d] (g/L/h)	Productos de fermentación (mM)[c]					
				mol/mol	g/g		Succ	Mal	Pir	Ace	Lac	For
E. coli C tipo salvaje[f]	DO_{550} 0,1, betaína 0,1 mM 0,2	5% de NBS	2,0±0,2	0,19±0,02	0,12	0,12±0,01	49±3	-[g]	33±10	152±30	98±24	262±19
KJ012	DO_{550} 0,1, betaína 0,1 mM	5% de NBS	0,3±0,1	0,20±0,01	0,13	0,04±0,01	6±0,4	-	-	26±1	-	-
KJ012	DO_{550} 0,1, betaína 0,1 mM, matraz agitado[h]	5% de NBS+MOPS	1,5	0,10	0,06	0,02	10	-	-	226	-	16
KJ012	DO_{550} 0,1 caldo Luria	5% de LB	1,5	0,70	0,50	0,09	108	-	-	61	<2	14
KJ012 (*ldhA, ackA, adhE*)	1ª TF: sin betaína, DO_{550} 0,1, transferencias de 120 h	5% de NBS	0,3	0,13	0,09	0,072	6	-	-	26	<2	-
	3ª TF: betaína 2 mM, DO_{550} 0,1, transferencias de 96 h	5% de NBS	0,7	0,28	0,18	0,128	26	-	-	71	<2	
(KJ017)	40ª TF: betaína 1 m, DO_{550} 0,1, transferencias de 24 h, K_2CO_3 3M + KOH 6N	5% de NBS	2,3	0,73	0,48	0,251	204	-	-	179	<2	151
	40ª TF: betaína 1 mM, DO_{550} 0,1, transferencias de 24 h, K_2CO_3 3M + KOH 6N	10% de NBS	1,7	0,74	0,49	0,354	288	-	-	181	38	199
KJ032 (*ldhA, ackA, adhE, focA, pflB*)	2ª TF: betaína 1 mM, DO_{550} 0,1, transferencias de 48 h, NaOAc 20 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N	5% de NBS	1,0	1,47	0,97	0,260	212	-	-	44	-	-
	15ª TF: betaína 1 mM, DO_{550} 0,01, transferencias de 24 h, NaOAc 5 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N	10% de NBS	1,4	1,07	0,71	0,736	596	331	9	170	<2	-
(KJ060)	5ª TF: betaína 1 mM, DO_{550} 0,01, transferencias de 24 h, sin NaOAc, K_2CO_3 3M + KOH 6N	10% de NBS	1,4	1,04	0,69	0,711	579	318	9	161	<2	-
KJ070 (*ldhA, ackA, adhE, focA, pflB, mgsA*)	1ª TF: betaína 1 mM, DO_{550} 0,01, TF 24 h, K_2CO_3 3M + KOH 6N,	5% de NBS	1,0	1,06	0,70	0,361	294	219	25	102	-	-
(KJ071)	50ª TF: betaína 1mM, DO_{550} 0,01, transferencias de 24 h, K_2CO_3 3M + KOH 6N	10% de NBS	1,1	0,71	0,47	0,419	341	626	<2	76	-	-

Cepa[a]	Condiciones de cultivo	Medio, Gluc (p/v)	Rend, celular[b] (g/L)	Rend, de succinato[c]		Prod, vol, prom,[d] (g/L/h)	Productos de fermentación (mM)[c]					
				mol/mol	g/g		Succ	Mal	Pir	Ace	Lac	For
KJ072 (*ldhA, ackA, adhE, focA, pflB, mgsA, poxB*)	2ª TF: betaína 1 mM, DO_{550} 0,01, transferencias de 24 h, K_2CO_3 3M + KOH 6N	10% de NBS	1,3	0,97	0,64	0,663	539	186	<2	95	-	-
	6ª TF: betaína 1 mM, DO_{550} 0,01, transferencias de 24 h, K_2CO_3 3M + KOH 6N	10% de AM1	1,2	1,34	0,88	0,733	596	38	4	112	-	-
(KJ073)	45ª TF: betaína 1 mM, DO_{550} 0,01, transferencias de 24 h, K_2CO_3 3M + KOH 6N	10% de AM1	1,5	1,26	0,83	0,858	699	313	103	172	-	-
KJ073[f]	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	2,3±0,1	1,20±0,09	0,77±0,03	0,82±0,01	668±8	118±13	55±22	183±27	-	-
KJ060[f]	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AMI	2,2±0,1	1,41±0,07	0,92±0,05	0,90±0,04	733±39	39±17	-	250±36	2±1	-
KJ060[f]	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N DO_{550} 0,60 inóculo	10% de AM1	2,2±0,1	1,61±0,12	1,05±0,09	0,77±0,04	622±8	17±5	1,5±1	180±13	2±1	-
KJ071[f]	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N DO_{550} 0,01 inóculo	10% de NBS	1,5±0,0	0,78±0,02	0,53±0,01	0,33±0,04	280±7	516±14	58±15	64±9	-	-

[a] Los clones se aislaron del caldo de fermentación en varios puntos y se les asignaron números de cepa, indicados por números entre paréntesis.

[b] Rendimiento celular estimado de la densidad óptica (3 DO_{550nm} = 1 g l^{-1} de peso seco celular).

[c] Los rendimientos de succinato se calcularon basándose en la glucosa metabolizada.

[d] La Productividad Volumétrica Promedio se calculó por el tiempo total de incubación.

[e] Abreviaturas: succ, succinato; mal, malato; pir, piruvato; ace; acetato; lac, lactato; for, formiato.

[f] Promedio de 3 o más fermentaciones con desviaciones típicas.

[g] Los guiones indican ausencia de producto.

[h] Matraz aeróbico agitado (100 rpm; 100 ml de NBS, matraz de 250 ml).

TABLA 4

Comparación de actividades de enzima de carboxilación en diferentes cepas

Enzima	Actividad específica [nmol min^{-1} (mg de proteína)$^{-1}$]					
	E. coli C	*E. coli* KJ012	*E. coli* KJ017	*E. coli* KJ073	*E. coli* K12[a]	*Actinobacillus succinogenes*[a]
PEP carboxilasa	20±2	25±2	17±1	27±2	140	10
PEP carboxi cinasa	295±23	162±11	700±68	7341±462	140	4.700
Enzima málica (NADH, carboxilación)	ND[b]	5±2	12±4	12±3	Desconocida	Desconocida
Enzima málica (NADPH carboxilación)	<1	<1	<1	<1	Desconocida	Desconocida

[a] Datos de van der Werf et al., 1997

[b] No se pudo medir en E. coli C salvaje debido a la presencia de lactato deshidrogenasa

TABLA 5

Composición de medio (excluyendo fuente de carbono)

Componente	Concentración (mmol L^{-1})	
	[a]NBS + betaína 1 mM	AM1 betaína 1 mM
KH_2PO_4	25,72	0
K_2HPO_4	28,71	0
$(NH_4)_2HPO_4$	26,50	19,92
$NH_4H_2PO_4$	0	7,56
Total de PO_4	80,93	27,48
Total de N	53,01	47,39
[b]Total de K	84,13	1,00
$MgSO_4$ $7H_2O$	1,00	1,50
$CaCl_2$ $2H_2O$	0,10	0
Tiamina HCl	0,015	0
Betaína-KCl	1,00	1,00
	(µmol L^{-1})[c]	
$FeCl_3$ $6H_2O$	5,92	8,88
$CoCl_2$ $6H_2O$	0,84	1,26
$CuCl_2$ $2H_2O$	0,59	0,88
$ZnCl_2$	1,47	2,20
Na_2MoO_4 $2H_2O$	0,83	1,24
H_3BO_3	0,81	1,21
$MnCl_2$ $4H_2O_2$	0	2,50
Total de sales	12,5 g L^{-1}	4,1 g L^{-1}

[a] NBS + betaína 1 mM: medios NBS modificados con betaína (1 mM).

[b] **El cálculo incluye KOH utilizado para neutralizar la provisión de partida de betaína - HCl.**

[c] **La provisión de partida de metal vestigial (1000X) se preparó en HCl 120 mM.**

TABLA 6

Cepas de *Escherichia coli*, plásmidos y cebadores usados en este estudio

Cepas de *Escherichia coli*		
Características Relevantes		Fuentes
Cepa B		
KJ073	*ΔldhA*::FRT *ΔadhE*::FRT *Δ(focA-pflB)*::FRT *ΔackA*::FRT *ΔmgsA ΔpoxB*	Jantama et al., 2008
KJ076	KJ073, *ΔackA*::*cat-sacB*, secuencia de detención de traducción	Descrito en la presente
KJ079	KJ073, *ΔackA*:: secuencia de detención de traducción	Descrito en la presente
TG200	KJ079, *ΔadhE*::*cat-sacB*	Descrito en la presente
TG201	TG200, *ΔadhE*	Descrito en la presente
TG202	TG201, *ΔldhA*::*cat-sacB*	Descrito en la presente
TG203	TG202, *ΔldhA*	Descrito en la presente
TG204	TG203, *Δ(focA-pflB)*::*cat-sacB*	Descrito en la presente
KJ091	TG204, *Δ(focA-pflB)*	Descrito en la presente
KJ098	KJ091, *ΔtdcDE*	Descrito en la presente
KJ104	KJ098, *ΔcitF*	Descrito en la presente
KJ110	KJ104, *ΔaspC*	Descrito en la presente
KJ119	KJ104, *ΔsfcA*	Descrito en la presente
KJ122	KJ110, *ΔsfcA*	Descrito en la presente
KJ134	KJ122, *ΔackA-pta*	Descrito en la presente
Plásmidos		
pKD46	*bla* γ *β exo* (recombinasa Red), replicón condicional de temperatura	Datsenko, 2000
pEL04	casete *cat-sacB*	Lee, 2001 Thomason 2005
pLOI2228	casete *cat*; FRT-*cat*-FRT	Martínez Morales et al., 1999

Cepas de *Escherichia coli*		
Características Relevantes		Fuentes
pLOI2511	casete *bla kan*; FRT-*kan*-FRT	Underwood et al., 2002
pLOI4131	*bla*; ligación de pLOI2228 (casete FRT-*cat*-FRT digerido con *Ban*I, tratado con klenow, digerido con *ClaI*) y pLOI2511 (digerido con *Nhe*I, tratado con Klenow, digerido con *ClaI*)	Descrito en la presente
pLOI4145	*bla;* pLOI4131 digerido con *EcoR*I, autoligación	Descrito en la presente
pLOI4146	*bla cat;* ligación de casete *cat-sacB* amplificada por PCR (usando cebadores JMcatsacBup3/down3) de pLOI4152, pLOI4153 digerido con *BamH*I/*Xho*I y digerido con *BamH*I/*Xho*I	Descrito en la presente
pLOI4151	casete *bla cat; cat-sacB*	Jantama et al., 2008
pLOI4152	casete *cat-sacB*; casete amplificada por PCR de pEL04 (usando cebadores JMpEL04F1/R1), digestión con *Bgl*II y autoligación	Descrito en la presente
pLOI4153	*bla*; ligación de pLOI4145 (digerido con *Kas*I/*Xma*I) y poliligador SfPBXPS digerido con *Kas*I/*Xma*I (recocido de oligonucleótidos complementarios SfPBXPSsense/SfPBXPScomp)	Descrito en la presente
pLOI4154	pLOI4146 digerido con *pac*I, autoligación	Descrito en la presente
pLOI4161	casete *bla cat; cat-sacB*	Descrito en la presente
pLOI4162	*bla cat*; ligación de casete *cat-sacB* (digerida con *Pac*I) de pLOI4146 y pLOI4161 digerido con *Pac*I	Descrito en la presente
pCR2.1-TOPO	*bla kan*; vector de clonación TOPO TA	Invitrogen
pLOI4158	*bla kan*; *ackA* (PCR) de *E. coli* C (usando cebadores JMackA-F1/R1), clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Descrito en la presente
pLOI4159	casete *cat-sacB* digerida con *Sma*I/*Sfo*I de pLOI4162, clonado en el producto inverso amplificado por PCR de pLOI4158 (usando JMackAup1/down1)	Descrito en la presente
pLOI4160	Digestión de pLOI4159 con *Pac*I, después autoligado	Descrito en la presente
pLOI4515	*bla kan; tdcG'-tdcFED-tdcC'* (PCR) de *E. coli* C (usando cebadores *tdcDE*-up/down) clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Descrito en la presente
pLOI4516	casete *cat-sacB* digerida con *Sma*I/*Sfo*I de pLOI4162 clonado en el producto inverso amplificado por PCR de pLOI4515 (usando cebadores *tdcDE*-F7/R7)	Descrito en la presente
pLOI4517	Producto inverso amplificado del fragmento por PCR de pLOI415 (usando cebadores *tdcDE*-F7/R7), tratado con cinasa, después autoligado	Descrito en la presente

Cepas de *Escherichia coli*		
	Características Relevantes	Fuentes
pLOI4629	*bla kan; citF* (PCR) de *E. coli* C (usando cebadores *citF*-up2/down2) clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Descrito en la presente
pLOI4630	casete *cat-sacB* digerida con *Sma*I/*Sfo*I de pLOI4162, clonado en el producto inverso amplificado por PCR de pLOI4629 (usando cebadores *citF*-2/3)	Descrito en la presente
pLOI4631	digestión con *Pac*I de pLOI4630, después autoligado	Descrito en la presente
pLOI4280	*bla kan; asp C* (PCR) de *E. coli* C (usando cebadores *aspC*-up/down), clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Descrito en la presente
pLOI4281	casete *cat-sacB* digerida con *Sma*I/*Sfo*I de pLOI4162, clonado en el producto inverso amplificado por PCR de pLOI4280 (usando cebadores *aspC*-1/2)	Descrito en la presente
pLOI4282	Producto inverso amplificado del fragmento por PCR de pLOI4280 (usando cebadores *aspC*-1/2), tratado con cinasa, después autoligado	Descrito en la presente
pLOI4283	*bla kan; sfcA* (PCR) de *E. coli* C (usando cebadores *sfcA*-up/down), clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Descrito en la presente
pLOI4284	casete *cat-sacB* digerida con *Sma*I/*Sfo*I de pLOI4162, clonado en el producto inverso amplificado por PCR de pLOI4283 (usando cebadores *sfcA*-1/2)	Descrito en la presente
pLOI4285	digestión de pLOI4284 con *Pac*I, después autoligado	Descrito en la presente
pLOI4710	*bla kan; ackA-pta* (PCR) de *E. coli* C (usando cebadores *ackA*-up/*pta*-down), clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Descrito en la presente
pLOI4711	casete *cat-sacB* digerida con *Sma*I/*Sfo*I de pLOI4162, clonado en el producto inverso amplificado por PCR de pLOI4710 (usando cebadores *ackA*-2/*pta*-2)	Descrito en la presente
pLOI4712	digestión de pLOI4711 con *Pac*I, después autoligado	Descrito en la presente
pLOI4413	*bla kan; ychE'-adhE-ychG'* (PCR) de *E. coli* C (usando cebadores up/down-*adhE*), clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Descrito en la presente
pLOI4419	Producto inverso amplificado del fragmento por PCR de pLOI4413 (usando cebadores IO-*adhE*-up/down), tratado con cinasa, después autoligado	Descrito en la presente
pLOI4415	*bla kan; ycaO'-focA-pflB-pflA'* (PCR) de *E. coli* C (usando cebadores up-*focA/Mid-pflA*), clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Descrito en la presente
pLOI4421	Producto inverso amplificado del fragmento por PCR de pLOI4415 (usando cebadores IO-*ycaO*-up/IO-*midpflB*-down), tratado con cinasa, después autoligado	Descrito en la presente

Cepas de *Escherichia coli*		
	Características Relevantes	Fuentes
pLOI4430	*bla kan; hslJ'-ldhA-ydbH'* (PCR) de *E. coli* C (usando cebadores *ldhA*-A/C) clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Descrito en la presente
pLOI4432	Producto inverso amplificado del fragmento por PCR de pLOI4424 (usando cebadores IO-*ldhA*-up/down), tratado con cinasa, después autoligado	Descrito en la presente
Series de cebadores		
JM4161 sense/comp	5'ACCGCATCAGGCGCCTAATTAATTAATCCCGG3' (SEQ ID NO: 30) 5'CCGGATTAATTAATTAGGCGCCTGATGCGGT3' (SEQ ID NO: 31)	Descrito en la presente
JMpEL04F 1/R1	5'CAGCAGATCTAAGTAAATCGCGCGGGTTTG3' (SEQ ID NO: 32) 5'CAGCAGATCTAGCGGCTATTTAACGACCCT3' (SEQ ID NO: 33)	Descrito en la presente
JM*ackA*-F1/R1	5'GCCTGAAGGCCTAAGTAGTA3' (SEQ ID NO: 34) 5'GCACGATAGTCGTAGTCTGA3' (SEQ ID NO: 35)	Descrito en la presente
JmackA up1/down1	5'GTTGAGCGCTTCGCTGTGAG3' (SEQ ID NO: 36) 5'GCCGCAATGGTTCGTGAACT3' (SEQ ID NO: 37)	Descrito en la presente
JmcatsacB up3/down3	5'CTCACCTCGAGTGTGACGGAAGATCACTTCG3' (SEQ ID NO: 38) 5'GTGCAGGATCCATCAAAGGGAAAACTGTCCATAT3' (SEQ ID NO: 39)	Descrito en la presente
SfPBXPS sense/comp	5'ATGTAGGCGCCATTAATTAATGGATCCACTATCTCGAGA TTAATTAATCCCGGGACTAT3' (SEQ ID NO: 40) 5'ATAGTCCCGGGATTAATTAATCTCGAGATAGTGGATCCA TTAATTAATGGCGCCTACAT3' (SEQ ID NO: 41)	Descrito en la presente
WM*adhE* A/C	5'ATGGCTGTTACTAATGTCGCTGAACTTAACGCACTCGTA GAGCGTCGGCACGTAAGAGGTTCCAA3' (SEQ ID NO: 42) 5'TTAAGCGGATTTTTTCGCTTTTTTCTCAGCTTTAGCCGGA GCAGCACACTGCTTCCGGTAGTCAA3' (SEQ ID NO: 43)	Descrito en la presente

Cepas de *Escherichia coli*		
Características Relevantes		Fuentes
WM*IdhA* A/C	5'ATGAAACTCGCCGTTTATAGCACAAAACAGTACGACAA GAAGTACGGCACGTAAGAGGTTCCAA3' (SEQ ID NO: 44) 5'TTAAACCAGTTCGTTCGGGCAGGTTTCGCCTTTTTCCAG ATTGCTACACTGCTTCCGGTAGTCAA3' (SEQ ID NO: 45)	Descrito en la presente
Series de iniciadores		
WM*pflB* A/C	5'TTACTCCGTATTTGCATAAAAACCATGCGAGTTACGGGC CTATAACGGCACGTAAGAGGTTCCAA3' (SEQ ID NO: 46) 5'TTACATAGATTGAGTGAAGGTACGAGTAATAACGTCCTG CTGCTGTTCTACACTGCTTCCGGTAGTCAA3' (SEQ ID NO: 47)	Descrito en la presente
tdcDE-up/down	5'CGCCGACAGAGTAATAGGTT3' (SEQ ID NO: 48) 5'TGATGAGCTACCTGGTATGG3' (SEQ ID NO: 49)	Descrito en la presente
tdcDE- F7/R7	5'CGATGCGGTGGCCAATTAAG3' (SEQ ID NO: 50) 5'GACGACGTGCTGGATTACGA3' (SEQ ID NO: 51)	Descrito en la presente
citF-up2/down2	5'GGGTATTCAGGCGTTCGATA3' (SEQ ID NO: 52) 5'GCCCGAGAGGATGACTATGT3' (SEQ ID NO: 53)	Descrito en la presente
citF-2/3	5'GGTGATCGATGTTGTGCATC3' (SEQ ID NO: 54) 5'CCCGTTCTTGTCGTTGAGAT3' (SEQ ID NO: 55)	Descrito en la presente
IO-*adhE*-up/down	5'GCTGCTCCGGCTAAAGCTGA3' (SEQ ID NO: 56) 5'ACGCTCTACGAGTGCGTTAA3' (SEQ ID NO: 57)	Descrito en la presente
up-*focA*/Mid-*pflB*	5'AGATCGCCAGCCGCTGCAAT3' (SEQ ID NO: 58) 5'AACCGTTGGTGTCCAGACAG3' (SEQ ID NO: 59)	Descrito en la presente
IO-*ycaO*-up/IO-*midpflB*-down	5'GCCTACATTGCGTAGGCTAT3' (SEQ ID NO: 60) 5'GCAGCAGGACGTTATTACTC3' (SEQ ID NO: 61)	Descrito en la presente
ldhA-A/C	5'ATGAAACTCGCCGTTTATAG3' (SEQ ID NO: 62) 5'TTAAACCAGTTCGTTGCCC3' (SEQ ID NO: 63)	Descrito en la presente

Cepas de *Escherichia coli*		
Características Relevantes		Fuentes
IO-*IdhA*-up/down	5'CGTTCGATCCGTATCCAAGT3' (SEQ ID NO: 64) 5'AGGCTGGAACTCGGACTACT3' (SEQ ID NO: 65)	Descrito en la presente
aspC-up/down	5'TCCATCGCTTACACCAAATC3' (SEQ ID NO: 66) 5'TGGGGGATGACGTGATATTT3' (SEQ ID NO: 67)	Descrito en la presente
aspC-1/2	5'AGATAACATGGCTCCGCTGT3' (SEQ ID NO: 68) 5'AGGAGCGGCGGTAATGTTC3' (SEQ ID NO: 69)	Descrito en la presente
sfcA-up/down	5'CTATGCTTGATCGGCAACCT3' (SEQ ID NO: 70) 5'ACGATCGCCTGGTTTTAATG3' (SEQ ID NO: 71)	Descrito en la presente
sfcA-1/2	5'TACCGCCGTACCTCCATCTA3' (SEQ ID NO: 72) 5'CGTAAGGGATATAAAGCGAACG3' (SEQ ID NO: 73)	Descrito en la presente
ackA-up/*pta*-down	5'CGGGACAACGTTCAAAACAT3' (SEQ ID NO: 74) 5'ATTGCCCATCTTCTTGTTGG3' (SEQ ID NO: 75)	Descrito en la presente
ackA-2/*pta*-2	5'AACTACCGCAGTTCAGAACCA3' (SEQ ID NO: 76) 5'TCTGAACACCGGTAACACCA3' (SEQ ID NO: 77)	Descrito en la presente

TABLA 7

Fermentación de glucosa en medio AM1 de sales minerales por cepas mutantes de *E. Coli*

Cepa	Condiciones de cultivo	Medio, Gluc (p/v)	Rend. celular[a] (g/L)	Rend. de succinato [b]		Prod. Vol. Prom.[c] (g/L/h)	Productos de fermentación (mM)[d,e,f]					
				mol/mol	g/g		Suc	Mal	Pir	Ace	Lac	For
KJ073	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (1:1), DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	2,3±0,1	1,20±0,09	0,77±0,03	0,82±0,01	668±8	118±13	55±22	183±27	-	-
KJ091	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (1:1) DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	2,2±0,1	1,19±0,02	0,78±0,01	0,84±0,01	687±3	109±3	72±5	155±6	-	-
KJ098	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (1:1) DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	2,3±0,1	1,30±0,04	0,85±0,02	0,79±0,01	644±9	-	42±8	88±1	-	-
KJ104	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (4:1) DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	1,8±0,1	1,31±0,01	0,86±0,01	0,78±0,03	634±25	5±1	78±5	90±10	-	-
KJ104	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (6:1) DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	1,9±0,1	1,30±0,01	0,85±0,01	0,77±0,01	625±4	3±2	94±5	81±2	-	-
KJ110	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (4:1) DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	2,0±0,1	1,28±0,02	0,84±0,01	0,79±0,01	640±10	4±1	76±6	106±11	-	-
KJ119	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (4:1) DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	2,0±0,1	1,33±0,07	0,87±0,01	0,82±0,01	672±10	4±0	64±18	95±14	-	-
KJ122	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (4:1) DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	2,3±0,1	1,50±0,02	0,98±0,01	0,92±0,01	750±1	0±0	122±21	94±13	-	-
KJ122	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (6:1) DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	2,0±0,2	1,54±0,02	1,01±0,01	0,97±0,04	787±35	6±3	59±6	110±7	-	-
KJ122	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (6:1) DO_{550} 0,15 inóculo	10% de AM1	2,1±0,01	1,57±0,09	1,03±0,06	0,93±0,06	756±49	0±0	124±13	122±9	-	-
KJ134	betaína 1 mM, K_2CO_3 3M + KOH 6N (6:1) DO_{550} 0,01 inóculo	10% de AM1	2,3±0,1	1,70[g]±0,03	1,11±0,02	0,83±0,02	674±15	13±2	22±9	37±5	-	

[a] Rendimiento celular estimado a partir de la densidad óptica (3 DO_{550nm} = 1 g l^{-1} de peso seco celular).

[b] Los rendimientos de succinato se calcularon basándose en la glucosa metabolizada.

[c] La Productividad Volumétrica Promedio se calculó para el tiempo total de incubación.

[d] Abreviaturas: succ, succinato; mal, malato; pir, piruvato; ace; acetato; lac, lactato; for, formiato.

[e] Estuvo presente etanol (153±39 mM) solo en el caldo de *E. coli* C.

[f] Todos los datos representan un promedio de 3 o más fermentaciones con desviaciones típicas.

[g] También se encontraron productos adicionales a pesar de los rendimientos casi teóricos de succinato. Basándose en el total de productos, los coproductos representaron 11%.

Referencias

Patente de EE. UU. Núm. 5.723.322.

Patente de EE. UU. Núm. 5.869.301.

Patente de EE. UU. Núm. 5.143.834. Glassner *et al.*. 1992.

Patente de EE. UU. Núm. 5.723.322. Guettler *et al.*. 1998.

Patente de EE. UU. Núm. 5.573.931. Guettler *et al.*. 1996a.

Patente de EE. UU. Núm. 5.505.004. Guettler *et al.*, 1996b.

AjI, S. J., Werkman, C. H. (1948) "Enzymatic fixation of carbon dioxide in α-ketoglutaric acid" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 34:491-498.

Andersson, C, Hodge, D., Berglund, K.A., Rova, U. (2007) "Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*", *Biotechnol Prog* 23(2):381-388.

Asghari, A., Bothast, R. J., Doran, J. B., Ingram, L. O. (1996), "Ethanol production from hemicellulose hydrolysates of agricultural residues using genetically engineered *Escherichia coli* strain KOH", *J. Industrial Microbiol*. 16:42-47.

Causey, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P, Ingram, L. O. (2004), "Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 :2235-2240.

Chao, Y. y Liao, J. C. (1993), "Alteration of growth yield by overexpression of phosphoenol pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli*", *Appl Environ Microbiol*. 59:4261-4265.

Chang, Y. Y., Cronan, J. E., Jr. (2000), "Conversion of *Escherichia coli* pyruvate decarboxylase to an 'alpha-ketobutyrate oxidase'" *Biochem. J*. 352:717-724.

Chatterjee, R., Cynthia, S.M., Kathleen, C, David, P.C., Donnelly, M.I. (2001), "Mutation of the ptsG gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*" *Appl Environ. Microbiol*. 67:148-154.

Cox, S.J., Levanon, S.S., Sánchez, A.M., Lin, H., Peercy, B., Bennett, G.N., San, K. Y. (2006), "Development of a metabolic network design and optimization framework incorporating implement constraints: A succinate production case study" *Metab. Engin*. 8:46-57.

Datsenko, K.A., Wanner, BX. (2000), "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-6645.

de Graef, M.R., Alexeeva, S., Snoep, J.L., de Mattos, M.J.T. (1999), "The steady-state internal rédox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated wit catabolic adaptation in *Escherichia coli*" *J. Bacteriol*. 181 :2351-235.

Delbaere, L.T.J., Sudom, A.M., Prasad, L., Leduc, Y., Goldie, H. (2004) "Structure/function studies of phosphoryl transfer by phosphoenolpyruvate carboxykinase" *Biochimica et Biophysica Acta*. 1679:271-278.

Du, C, Lin, S.K., Koutinas, A., Wang, R., Webb, C. (2007) "Succinic acid production from wheat using a biorefining strategy" *Appl Microbiol Biotechnol*. 76(6):1263-1270.

Egyud, L. G., Szent-Gyorgyi, A. (1966) "On the regulation of cell division" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56:203-207.

Farmer, W. y Liao, J.C. (1997) "Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli", Appl. Environ. Microbiol*. 63:3205-3210.

Fraenkel, D.G. (1996), Capítulo 14, "Glycolysis" en A. Bock, R. Curtiss III, J. B. Kaper, F. C. Neidhardt, T. Nystrom, K. E. Rudd, y C. L. Squires (ed.), "EcoSal — *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. [en línea] http://www.ecosal.org. ASM Press, Washington, D.C.

Gokarn, R.R., Eiteman, M, A., Altman, E. (2000) "Metabolic analysis of *Escherichia coli* in the presence and absence of carboxylating enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase" *Appl. Environ. Microbiol*. 66:1844-1850.

Goldie, A.H. y Sanwal, B. D. (1980a) "Genetic and physiological characterization of *Escherichia coli* mutants deficient in phosphoenolpyruvate carboxykinase activity" *J Bacteriol*. 141(3):1115-1121.

Goldie, A.H. y Sanwal, B. D. (1980b) "Allosteric control by calcium and mechanism of desensitization of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Escherichia coli*" *J. Biol. Chem*. 255(4):1399-1405.

Gottschalk, G. (1985) “Bacterial metabolism”, 2ª ed. Springer-Verlag, Nueva York.

Grabar, T.B., Zhou, S., Shanmugam, K.T., Yomano, L. P., Ingram, L. O. (2006) “Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in L(+) and D(-) lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*” *Biotechnol. Lett.* 28: 1527-1535.

Guest, J.R., Angier, SJ., Russell (1989) “Structure, expression, and protein engineering in the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*” *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 573:76- 99.

Hesslinger, C, Fairhurst, S.A., Sawers, G. (1998) “Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L threonine to propionate” *Mol Microbiol* 27(2):477-492.

Hopper, D. J., Cooper, R.A. (1971) “The regulation of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase: a new control site in glycolysis” *FEBS Lett* 13:213-216.

Iverson, T. M., Luna-Chavez, C, Croal, L. R., Cecchini, G., Rees, D. C. (2002) “Crystallographic studies of the *Escherichia coli* quinol-fumarate reductase with inhibitors bound to the quinol-binding site. 2002” *J. Biol. Chem*. 277:16124-16130.

Jantama, K., Haupt, MJ., Svoronos, S.A., Zhang, X., Moore, J. C, Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2008) “Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *E. coli* C that produce succinate and malate” *Biotech. Bioeng*. 99(5):1 140-1153.

Jarboe, L.R., Hyduke, D.R., Tran, L.M., Chou, KJ., Liao, J.C. (2008) “Determination of the *Escherichia coli* S-nitrosoglutathione response network using integrated biochemical and systems analysis” *J Biol Chem*. 283: 5148-5157.

Kao, K.C., Tran, L. M., Liao, J.C. (2005) “A global regulatory role of gluconeogenic genes in *Escherichia coli* revealed by transcriptome network analysis” *J Biol Chem* 280:36079-36087.

Karp, P.D., Keseler, LM., Shearer, A., Latendresse, M., Krummenacker, M., Paley, S.M., Paulsen, LT., Collado-Vides, J., Gamma-Castro, S., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Penaloza-Spinola, M., Bonavides-Martínez, C, Ingraham, J. (2007) “Multidimensional annotation of *Escherichia coli* K-12 genome” *Nucl Acids Res*. 35(22):7577-7590.

Keseler, LM., Collado-Vides, J., Gamma-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Karp, P.D. (2005) “Ecocyc: A comprehensive database resource for *Escherichia coli”, Nucl Acids Res* 33:D334-D337.

Kessler, D., y Knappe, J. (1996) “Anaerobic dissimilation of pyruvate”, en Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umbarger HE, editores, “*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology”. ASM Press, Washington, D. C. p. 199-205.

Kim, P., Laivebieks, M., Vieille, C, Zeikus, J. G. (2004) “Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*” *Appl Environ Microbiol*. 70(2): 1238-41.

Krebs, A., Bridger, W. A. (1980) “The kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Escherichia coli”, Can J Biochem* 58(4): 309-318.

Kulla, H. y Gottschalk, G. (1977) “Energy-dependent inactivation of citrate lyase in *Enterobacter aerogenes*” *J. Bacleriol*. 132(3): 764-770.

Laivenieks, M., Vieille, C, Zeikus, J.G. (1997) “Cloning, sequencing, and overexpression of the *Anaerobiospirillum succiniciproducens* phosphoenolpyruvate carboxykinase (pckA) gene” *Appl Environ Microbiol* 63(6): 2273-2280.

Lee, E-C, Yu, K., Martínez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D. A., Court, D. L., Jenkins, N.A., y Copeland, N.G. (2001) “A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA” *Genomics* 73: 56-65.

Lee, S. Y., Hong, S. H., Lee, S. H., Park, SJ. (2004) “Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis” *Macromol. Biosci*. 4:157-164.

Lee, SJ, Lee ,D.Y., Kim, T.Y., Kim, B.H., Lee, J., Lee, S.Y. (2005) “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and in silico gene knockout simulation” *Appl Environ Microbiol* 71 :7880- 7887.

Lee, SJ., Song, H., Lee, S.Y. (2006) “Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succic acid production” *Appl Environ Microbiol* 72(3): 1939, 1948.

Lin, H., Bennett, G.N., San, K. Y. (2005a) "Chemostat culture characterization of *Escherichia coli* mutant strains metabolically engineered for aerobic succinate production: A study of the modified metabolic network based on metabolite profile, enzyme activity, and gene expression profile" *Metab. Engin*. 7:337-352.

Lin, H., Bennett, G.N., San, K. Y. (2005b) "Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield" *Metab. Engin*. 7:116-127.

Lin, H., Bennett, G.N., San, K.Y. (2005c) "Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli*" *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 32:87-93.

Lin, H., Bennett, G.N., San, K.Y. (2005d) "Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions" *Biolechnol Bioeng* 90:775-779.

Lutgens, M., and Gottschalk, G. (1980) "Why a co-substrate is required for the anaerobic growth of *Escherichia coli* on citrate" *J. Gen Microbiol.* 119: 63-70.

Martínez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Yomano, L. P., York, S. W., Ingram, L. O. (2007) "Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli*" *Biotechnol. Lett*. 29:397-404.

Martínez-Morales, F., Borges, A.C., Martínez, A., Shanmugam, K.T., Ingram, L. O. (1999) "Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction" *J Bacteriol*. 181 :7143- 7148.

McKinlay, J. B., Zeikus, J. G., Vieille, C. (2005) "Insights into *Actinohacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium" *Appl Environ Microbiol*. 71(1 1):6651-6656.

McKinlay, J.B., Vieille, C. (2008) "^{13}C-metabolic flux analysis of *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism at different $NaHCO_3$ and H_2 concentrations" *Metab. Eng*. 10:55-68.

McKinlay, J. B., Vieille, C, Zeikus, J. G. (2007) "Prospects for a bio-based succinate industry" *Appl Microbiol Biolechnol*. 76(4):727-740.

Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., Soucaille, P. (2007) "A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer and productivity" *Bioiechnol Bioeng*. 99(1):129-135.

Miller, J.H. (1992) "A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria", Cold Spring Harbor Press.

Millard, C.S., Chao, Y.P., Liao, J.C., Donnelly, M.I. (1996) "Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli" Appl Environ. Microbiol*. 62:1808-1810.

Morikawa, M., K. Izui, *et al.*. (1980) "Regulation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors in vivo. Estimation of the activities in the cells grown on various compounds" *J Biochem* (Tokio) 87(2): 441-449.

Moniruzzaman, M. *et al.*. (1997) "Isolation and molecular characterization of high- performance cellobiose-fermenting spontaneous mutants of ethanologenic *Escherichia coli* K011 containing the *Klebsiella oxytoca casAB* operon" *Appl. Environ. Microbiol*. 63:4633-4637.

Nilekani, S., Sivaraman, C. (1983) "Purification and properties of citrate lyase from *Escherichia coli*" *Biochemistry* 22(20);4657-63.

Oh, M.K., Rohlin, L., Kao, K.C., Liao, J.C. (2002) "Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*" *J Biol Chem* 277: 13175-13183.

Okino, S., Inui. M., Yukawa, H. (2005) "Production of organic acids by *Corynebacterium glutanicum* under oxygen deprivation" *Appl Microbiol Biotechnol* 68:475-480.

Posfai, G., Koob, M.D., Kirkpatrick, H.A., Blattner, F.C. (1997) "Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: Isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome" *J. Bacteriol*. 179:4426-4428.

Quentmeier, A., Holzenburg, A., Mayer, F., Antranikian, G. (1987) "Reevaluation of citrate lyase from *Escherichia coli*" *Biochim Biophys Acta* 913(1): 60-5.

Reed, J.L., Vo, T.D., Schilling, C.H., Palsson, B.O. (2003) "An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR)" *Genome Biol*, 4(9):R54.

Reitzer, L., fecha de entrada 6 de julio de 2004. capítulo 3.6.1.3, "Biosynthesis of Glutamate, Aspartate, Asparagine, L-Alanine, and D-Alanine", en A. Bock, R. Curtiss III, J. B. Kaper, F. C. Neidhardt, T. Nyström, K. E. Rudd, y C. L. Squires (ed.), "EcoSal—*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology [en línea], http://www.ecosal.org. ASM Press, Washington, D. C.

Samuelov, N.S., Lamed, R., Lowe, S., Zeikus, J.G. (1991) "Influence of CO_2-HCO_3 levels and pH on growth, succinate production, and enzyme-activities of *Anaerobiospirillum succiniproducens*" *Appl. Environ. Microbiol*. 57: 3013-3019.

Sánchez, A.M., Bennett, G.N., San, K.Y. (2005a) "Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity" *Metabolic Engineering* 7:229-239.

Sánchez, A.M., Bennett, G.N., San, K.Y. (2005b) "Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant" *Biotechnol. Prog*. 21 : 358-365.

Sánchez, A.M., Bennett, G.N., San, K.Y. (2006) "Batch culture characterization and metabolic flux analysis of succinate-producing *Escherichia coli* strains" *Metabolic Engineering* 8: 209-226.

Sanwal, B. D. y Smando, R. (1969a) "Malic enzyme of *Escherichia coli*: Possible mechanism for allosteric effects" *J Biol Chem*. 244(7): 1824-1830.

Sanwal, B. D. y Smando, R. (1969b) "Malic enzyme of *Escherichia coli*: Diversity of the effectors controlling enzyme activity" *J Biol Chem*. 244(7): 1817-1823.

Sanwal, B.D. (1970a) "Allosteric controls of amphibolic pathways in bacteria" *Bacteriol. Rev*. 34:20-39.

Sanwal, B.D. (1970b) "Regulatory characteristics of the diphosphopyridine nucleotide-specific malic enzyme of *Escherichia coli*" *J Biol Chem*. 245(5): 1212-1216.

Sanwal, B.D. (1970c) "Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotide as allosteric effectors: A control of glucose 6-phosphate dehydrogenase" *J Biol Chem* 245(7):1625-1631.

Sawers, G., Bock, A. (1988) "Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12" *J. Bacteriol*ogy. 170:5330-5336.

Song, H., Lee, J.W., Choi, S., You, J.K., Hong, W.H., Lee, S.Y. (2007) "Effects of dissolved CO2 levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production", *Biotechnol Bioeng*. 98(6):1296-1304.

Storici, F., Coglievina, M., Bruschi, CV. (1999) "A 2-µm DNA-based maker recycling system for multiple gene disruption in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast* 15:271-283.

Stols, L., Donnelly, M.I. (1997) "Production of succinic acid through overexpression of NAD dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant" *Appl, Environ. Microbiol*. 63:2695-2701.

Thomason, L., Court, D. L., Bubunenko, M., Constantino, N., Wilson, H., Datta, S., Oppenheim, A. (2005) "Recombineering: Genetic Engineering in Bacteria Using Homologous Recombination", secciones 1.16.1-1.16.21, en F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Klingston, D. D. Moore, J. G. Deidman, J. A. Smith, y K. Struhl (Eds.), "Current Protocols in Molecular Biology". John Wiley & Sons Inc., Nueva York.

Underwood, S. A., Buszko, M.L., Shanmugam, K.T., Ingram, L. O. (2004) "Lack of protective osmolytes limits final cell density and volumetric productivity of ethanologenic *Escherichia coli* KOI I during xylose fermentation" *Appl. Environ. Microbiol*. 70(5): 2734-40.

Underwood, S.A., Buszko, M.L., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2002) "Genetic changes to optimize carbon partitioning between ethanol and biosynthesis in ethanologenic *Escherichia coli*" *Appl Environ Microbiol*. 68(12): 6263-6272.

Unden, G. y Kleefeld, A. Fecha de entrada 30 de julio de 2004, capítulo 3.4.5, "C_4-Dicarboxylate Degradation in Aerobic and Anaerobic Growth", en A. Bock, R. Curtiss III, J. B. Kaper, F. C. Neidhardt, T. Nyström, K. E. Rudd y C. L. Squires (ed.), "EcoSal —*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology [en línea], http://www.ecosal.org. ASM Press, Washington, D. C.

van der Werf, M. J., M. V. Guettler, M. K. Jain, y J. G. Zeikus (1997) "Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus sp*. 130Z" *Arch. Microbiol* 167:332-342.

Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E. (2002a) "Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli" Appl. Environ. Microbiol*. 68: 1715-1727.

Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E. (2002b) “Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 28, 325-332.

Wang, Q., Chen, X., Yang, Y., Zhao, X. (2006) “Genome-scale in silico aided metabolic analysis and flux comparisons of *Escherichia coli* to improve succinate production” *Appl Microbiol Biotechnol* 73:887-894.

Wendisch, V. F., Bott, M., Eikmanns, BJ. (2006) “Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids” *Curr Opin Microbiol* 9:1-7.

Wood, B.E., Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O. (2005) “Development of industrial medium required elimination of the 2,3-butanediol fermentation pathway to maintain ethanol yield in an ethanologenic strain of *Klebsiella oxytoca” Biotechnol. Prog*. 21 :1366-1372.

Wright, J.A. y Sanwal, B. D. (1969) “Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotide as allosteric effectors: Control of phosphoenolpyruvate carboxykinase” *J Biol Chem*. 244(7):1838-1845.

Yun, N. R., San, K. Y., Bennett, G.N. (2005) “Enhancement of lactate and succinate formation in adhE or pta-ackA mutants of NADH dehydrogenase-deficient *Escherichia coli*” *J. Appl. Microbiol*. 99:1404-1412.

Zhang, X., Jantama, K., Moore, J. C, Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2007) “Production of L-alaninc by metabolically engineered *Escherichia coli” Appl. Microbiol Biotechnol*. 77: 355-366.

Zhou, S., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2003) “Functional replacement of the *Escherichia coli* D-(-)-lactate dehydrogenase gene (idhA) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (idhL) from *Pediococcus acidilactici*” *Appl. Environ. Microbiol*. 69:2237-2244.

Zhou, S., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (2006) “Betaine tripled the volumetric productivity of D-(-)-lactate by *Escherichia coli* strain SZ132 in mineral salts medium” *Biotechnol. Lett*. 28:671-676.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> University of Florida Research Foundation, Inc. Jantama, Kaemwich Haupt, Mark John Zhang, Xueli Moore, Jonathan C. Shanmugam, Keelnatham T. Ingram, Lonnie O'Neal

<120> Materiales y Métodos para la Producción Eficaz de Succinato y Malato

<130> B939EPPC

<150> US 60/895.806
<151> 2007-03-20

<160> 77

<170> Patent In versión 3.3

<210> 1
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de detención de la traducción

<400> 1
gcctaattaa ttaatccc 18

<210> 2
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ldhA

<400> 2
atgaactcgc cgttttatag cacaaaacag tacgacaaga agtacgtgta ggctggagct 60

gcttc 65

<210> 3
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ldhA

<400> 3
ttaaaccagt tcgttcgggc aggtttcgcc tttttccaga ttgctcatat gaatatcctc 60

cttag 65

<210> 4
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para adhE

<400> 4
atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtgtgta ggctggagct 60

gcttc 65

<210> 5
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para adhE

<400> 5
ttaagcggat tttttcgctt ttttctcagc tttagccgga gcagccatat gaatatcctc 60

cttag 65

<210> 6
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ackA

<400> 6
atgtcgagta agttagtact ggttctgaac tgcggtagtt cttcagtgta ggctggagct 60

gcttc 65

<210> 7
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ackA

<400> 7
tcaggcagtc aggcggctcg cgtcttgcgc gataaccagt tcttccatat gaatatcctc 60

cttag 65

<210> 8
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para focA-pIfB

<400> 8
ttactccgta tttgcataaa aaccatgcga gttacgggcc tataagtgta ggctggagct 60

gcttc 65

<210> 9
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para focA-pIfB

<400> 9
atagattgag tgaaggtacg agtaataacg tcctgctgct gttctcatat gaatatcctc 60

cttag 65

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

<220>
<223> Serie de cebadores para JMcatsacB

<400> 10
ttagctagca tgtgacggaa gatcacttcg 30

<210> 11
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JMcatsacB

<400> 11
ccgctagcat caaagggaaa actgtccata t 31

<210> 12
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para cat-up2/sacB-down2

<400> 12
agagaggata tctgtgacgg aagatcactt cg 32

<210> 13
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para cat-up2/sacB-down2

<400> 13
agagaggata tcgaattgat ccggtggatg ac 32

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para mgsA-up/down

<400> 14
cagctcatca accaggtcaa 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para mgsA-up/down

<400> 15
aaaagccgtc acgttattgg 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para mgsA-1/2

<400> 16
agcgttatct cgcggaccgt 20

<210> 17
<211> 20

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para mgsA-1/2

<400> 17
aagtgcgagt cgtcagttcc 20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para poxB-up/down

<400> 18
aagcaataac gttccggttg 20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para poxB-up/down

<400> 19
ccactttatc cagcggtagc 20

<210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para poxB-1/2

<400> 20
gacgcggtga tgaagtgat 19

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para poxB-1/2

<400> 21
tttggcgata taagctgcaa 20

<210> 22
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para pck-F/R

<400> 22
ttggctaagg agcagtgaaa tgcgcgtta 29

<210> 23
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para pck-F/R

<400> 23
cacgacaaaa gaagggtaaa taaac 25

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para pck-2/3

<400> 24
ttgttaacgc gcatttcact 20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para pck-2/3

<400> 25
gcgatagcgg ctactgtcat 20

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

<220>
<223> Serie de cebadores para pck (RT-PCR)

<400> 26
gacgatacca ctcgcgat 18

<210> 27
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para pck (RT-PCR)

<400> 27
gtcgacaacg aacagacgt 19

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

<220>
<223> Serie de cebadores para birA (RT-PCR)

<400> 28
atcgtgatgg cggaagt 17

<210> 29
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para birA (RT-PCR)

<400> 29
cttgcgatcc tgcagatag 19

<210> 30
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JM4161 sense/comp

<400> 30
accgcatcag gcgcctaatt aattaatccc gg 32

<210> 31
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JM4161 sense/comp

<400> 31
ccgggattaa ttaattaggc gcctgatgcg gt 32

<210> 32
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JMpEL04F1/R1

<400> 32
cagcagatct aagtaaatcg cgcgggtttg 30

<210> 33
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JMpEL04F1/R1

<400> 33
cagcagatct agcggctatt taacgaccct 30

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JMackA-F1/R1

<400> 34
gcctgaaggc ctaagtagta 20

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JMackA-F1/R1

<400> 35
gcacgatagt cgtagtctga 20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Serie de cebadores para JMackA up1/down1

<400> 36
gttgagcgct tcgctgtgag 20

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JMackA up1/down1

<400> 37
gccgcaatgg ttcgtgaact 20

<210> 38
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JMcatsacB up3/down3

<400> 38
ctcacctcga gtgtgacgga agatcacttc g 31

<210> 39
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para JmcatsacB up3/down3

<400> 39
gtgcaggatc catcaaaggg aaaactgtcc atat 34

<210> 40
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para SfPBXPS sense/comp

<400> 40
atgtaggcgc cattaattaa tggatccact atctcgagat taattaatcc cgggactat 59

<210> 41
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para SfPBXPS sense/comp

<400> 41
atagtcccgg gattaattaa tctcgagata gtggatccat taattaatgg cgcctacat 59

<210> 42
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para WMadhE A/C

<400> 42
atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtcggca cgtaagaggt 60

tccaa 65

<210> 43
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para WMadhE A/C

<400> 43
ttaagcggat tttttcgctt ttttctcagc tttagccgga gcagcacact gcttccggta 60

gtcaa 65

<210> 44
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para WmldhA A/C

<400> 44
atgaaactcg ccgtttatag cacaaaacag tacgacaaga agtacggcac gtaagaggtt 60

ccaa 64

<210> 45
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para WMldhA A/C

<400> 45
ttaaaccagt tcgttcgggc aggtttcgcc tttttccaga ttgctacact gcttccggta 60

gtcaa 65

<210> 46
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para WMpflB A/C

<400> 46
ttactccgta tttgcataaa aaccatgcga gttacgggcc tataacggca cgtaagaggt 60

tccaa 65

<210> 47
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para WMpflB A/C

<400> 47
ttacatagat tgagtgaagg tacgagtaat aacgtcctgc tgctgttcta cactgcttcc 60

ggtagtcaa 69

<210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para tdcDE-up/down

<400> 48
cgccgacaga gtaataggtt 20

<210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para tdcDE-up/down

<400> 49
tgatgagcta cctggtatgg 20

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para tdcDE-F7/R7

<400> 50
cgatgcggtg gccaattaag 20

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para tdcDE-F7/R7

<400> 51
gacgacgtgc tggattacga 20

<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para citF-up2/down2

<400> 52
gggtattcag gcgttcgata 20

<210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para citF-up2/down2

<400> 53
gcccgagagg atgactatgt 20

<210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para citF-2/3

<400> 54
ggtgatcgat gttgtgcatc 20

<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para citF-2/3

<400> 55
cccgttcttg tcgttgagat 20

<210> 56
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para IO-adhE-up/down

<400> 56
gctgctccgg ctaaagctga 20

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para IO-adhE-up/down

<400> 57
acgctctacg agtgcgttaa 20

<210> 58
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para up-focA/Mid-pflB

<400> 58
agatcgccag ccgctgcaat 20

<210> 59
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para up-focA/Mid-pflB

<400> 59
aaccgttggt gtccagacag 20

<210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para IO-ycaO-up/IO-midpflB-down

<400> 60
gcctacattg cgtaggctat 20

<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para IO-ycaO-up/IO-midpflB-down

<400> 61
gcagcaggac gttattactc 20

<210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ldhA-A/C

<400> 62
atgaaactcg ccgtttatag 20

<210> 63
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ldhA-A/C

<400> 63
ttaaaccagt tcgttgccc 19

<210> 64
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para IO/ldhA-up/down

<400> 64
cgttcgatcc gtatccaagt 20

<210> 65
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para IO-ldhA-up/down

<400> 65
aggctggaac tcggactact 20

<210> 66
<211> 20

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para aspC-up/down

<400> 66
tccatcgctt acaccaaatc 20

<210> 67
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para aspC-up/down

<400> 67
tgggggatga cgtgatattt 20

<210> 68
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para aspC-1/2

<400> 68
agataacatg gctccgctgt 20

<210> 69
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para aspC-1/2

<400> 69
aggagcggcg gtaatgttc 19

<210> 70
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para sfcA-up/down

<400> 70
ctatgcttga tcggcaacct 20

<210> 71
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para sfcA-up/down

<400> 71
acgatcgcct ggttttaatg 20

<210> 72
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para sfcA-1/2

<400> 72
taccgccgta cctccatcta 20

<210> 73
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para sfcA-1/2

<400> 73
cgtaagggat ataaagcgaa cg 22

<210> 74
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ackA-up/pta-down

<400> 74
cgggacaacg ttcaaaacat 20

<210> 75
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ackA-up/pta-down

<400> 75
attgcccatc ttcttgttgg 20

<210> 76
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ackA-2/pta-2

<400> 76
aactaccgca gttcagaacc a 21

<210> 77
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Serie de cebadores para ackA-2/pta-2

<400> 77
tctgaacacc ggtaacacca 20

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana modificada genéticamente que comprende modificaciones genéticas para los siguientes genes objetivo: (a) acetato cinasa; (b) lactato deshidrogenasa; (c) alcohol deshidrogenasa; (d) transportador de formiato y (e) pirivato formiato liasa, anulando dichas modificaciones genéticas la actividad enzimática del polipéptido producido por dicho gen objetivo.

2. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es *Escherichia coli*, *Gluconobacter oxydans, Gluconobacter asaii, Achromobacter delmarvae, Achromobacter viscosus, Achromobacter lacticum, Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium radiobacter, Alcaligenes faecalis, Arthrobacter citreus, Arthrobacter tumescens, Arthrobacter paraffineus, Arthrobacter hydrocarboglutamicus, Arthrobacter oxydans, Aureobacterium saperdae, Azotobacter indicus, Brevibacterium ammoniagenes, divaricatum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium flavum, Brevibacterium globosum, Brevibacterium fuscum, Brevibacterium ketoglutamicum, Brevibacterium helcolum, Brevibacterium pusillum, Brevibacterium testaceum, Brevibacterium roseum, Brevibacterium immariophilium, Brevibacterium linens, Brevibacterium protopharmiae, Corynebacterium acetophilum, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium callunae, Corynebacterium acetoacidophilum, Corynebacterium acetoglutamicum, Enterobacter aerogenes, Erwinia amylovora, Erwinia carotovora, Erwinia herbicola, Erwinia chrysanthemi, Flavobacterium peregrinum, Flavobacterium fucatum, Flavobacterium aurantinum, Flavobacterium rhenanum, Flavobacterium sewanense, Flavobacterium breve, Flavobacterium meningosepticum, Micrococcus sp.* CCM825*, Morganella morganii, Nocardia opaca, Nocardia rugosa, Planococcus eucinatus, Proteus rettgeri, Propionibacterium shermanii, Pseudomonas synxantha, Pseudomonas azotoformans, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas ovalis, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas acidovolans, Pseudomonas mucidolens, Pseudomonas testosteroni, Pseudomonas aeruginosa, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous, Rhodococcus sp.* ATCC 15592*, Rhodococcus sp.* ATCC 19070*, Sporosarcina ureae, Staphylococcus aureus, Vibrio metschnikovii, Vibrio tyrogenes, Actinomadura madurae, Actinomyces violaceochromogenes, Kitasatosporia parulosa, Streptomyces coelicolor, Streptomyces flavelus, Streptomyces griseolus, Streptomyces lividans, Streptomyces olivaceus, Streptomyces tanashiensis, Streptomyces virginiae, Streptomyces antibioticus, Streptomyces cacaoi, Streptomyces lavendulae, Streptomyces viridochromogenes, Aeromonas salmonicida, Bacillus pumilus, Bacillus circulans, Bacillus thiaminolyticus, Escherichia freundii, Microbacterium ammoniaphilum, Serratia marcescens, Salmonella typhimurium, Salmonella schottmulleri,* o *Xanthomonas citri*.

3. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha cepa bacteriana modificada es *Escherichia coli* , preferiblemente *E. coli* B.

4. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en donde los genes objetivo están desactivados.

5. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los siguientes genes objetivo están desactivados: a) acetato cinasa, b) lactato deshidrogenasa, c) alcohol deshidrogenasa, d) pirivato formiato liasa, y e) piruvato oxidasa.

6. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha cepa bacteriana comprende adicionalmente un gen de metilglioxal sintasa desactivado.

7. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde ésta comprende modificaciones genéticas para un gen de citrato liasa, un gen de lactato deshidrogenasa, un gen de alcohol deshidrogenasa, un gen de acetato cinasa, un gen de transportador de formiato, un gen de piruvato formiato liasa, un gen de metilglioxal sintasa, un gen de piruvato oxidasa, y uno o más de los siguientes genes objetivo: a) aspartato amino transferasa, b) fosfato acetil transferasa, c) enzima málica, y/o d) propionato cinasa/α-cetobutirato formiato liasa; desactivando dicha modificación genética la actividad enzimática del polipéptido producido por dicho gen objetivo.

8. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente está evolucionada metabólicamente.

9. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde los genes, o porciones de los mismos están suprimidos o está desactivados con mutaciones de desplazamiento de marco, mutaciones puntuales, inserción de codones de detención, o combinaciones de los mismos.

10. La cepa bacteriana modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es una cepa de *E. coli* y no contiene un gen exógeno o fragmento del mismo.

11. Una cepa bacteriana modificada genéticamente, en donde dicha cepa bacteriana modificada genéticamente es KJ032 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50024), KJ060 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50025), KJ070 (depositada en la Colección de

Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50026), KJ071 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50027), KJ072 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50028), KJ073 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50029), KJ091 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50110), KJ098 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50111), KJ104 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50112), KJ110 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50113), KJ119 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50114) o KJ122 (depositada en la Colección de Cultivos para Investigación Agrícola con NRRL B-50115).

12. Un método de cultivo o desarrollo de una cepa bacteriana modificada genéticamente que comprende inocular un medio de cultivo con una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y cultivar o desarrollar dicha cepa bacteriana modificada genéticamente.

13. Un método para producir succinato que comprende cultivar una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en condiciones que permiten la producción de succinato.

14. Una composición que comprende una o más cepas bacterianas modificadas genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un medio.

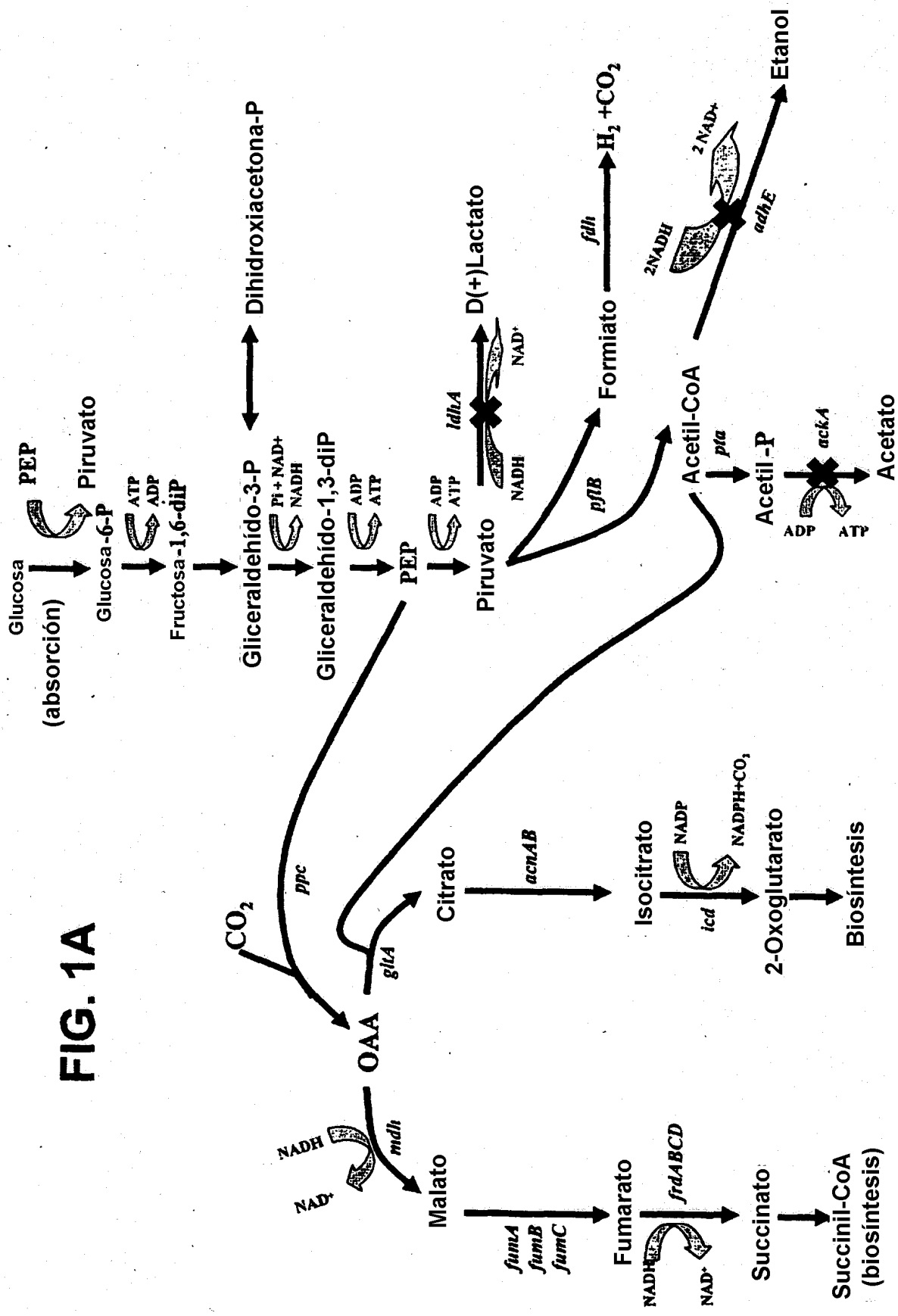
Glucosa
(absorción)
PEP
Piruvato
Glucosa-6-P
ATP
ADP
Fructosa-1,6-diP
Gliceraldehído-3-P
Pi + NAD+
NADH
Dihidroxiacetona-P
Gliceraldehído-1,3-diP
ADP
ATP
PEP
ADP
ATP
Piruvato
ldhA
NADH
NAD+
D(+)Lactato
pflB
Formiato
fdh
H2 +CO2
Acetil-CoA
2NADH
2 NAD+
adhE
Etanol
pta
Acetil -P
ackA
ADP
ATP
Acetato
CO2
ppc
OAA
gltA
Citrato
acnAB
Isocitrato
NADP
NADPH+CO2
icd
2-Oxoglutarato
Biosíntesis
NADH
NAD+
mdh
Malato
fumA
fumB
fumC
Fumarato
NADH
NAD+
frdABCD
Succinato
Succinil-CoA
(biosíntesis)

FIG. 1A

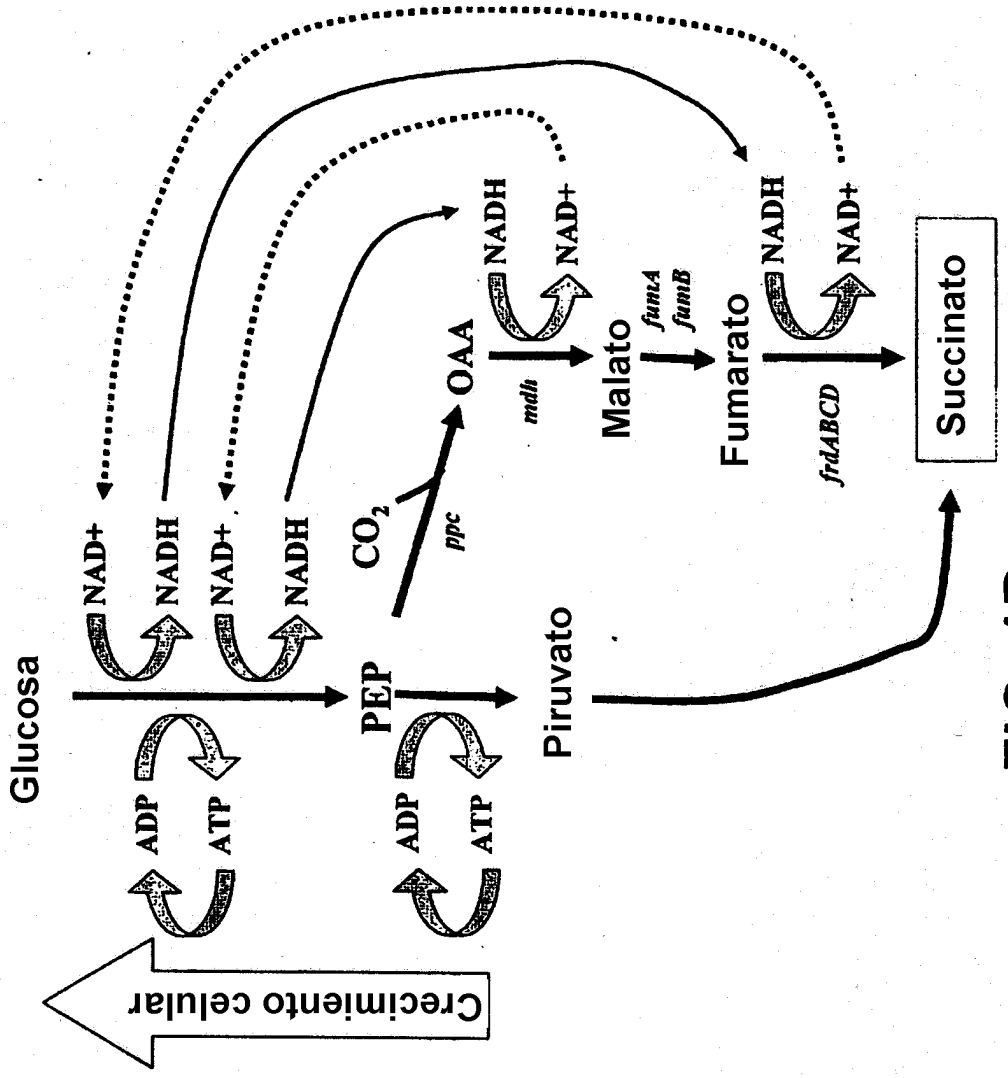
Glucosa
NAD+
NADH
NAD+
NADH
ADP
ATP
ADP
ATP
PEP
Piruvato
CO2
ppc
OAA
NADH
NAD+
mdh
Malato
fumA
fumB
Fumarato
NADH
NAD+
frdABCD
Succinato
Crecimiento celular

FIG. 1B

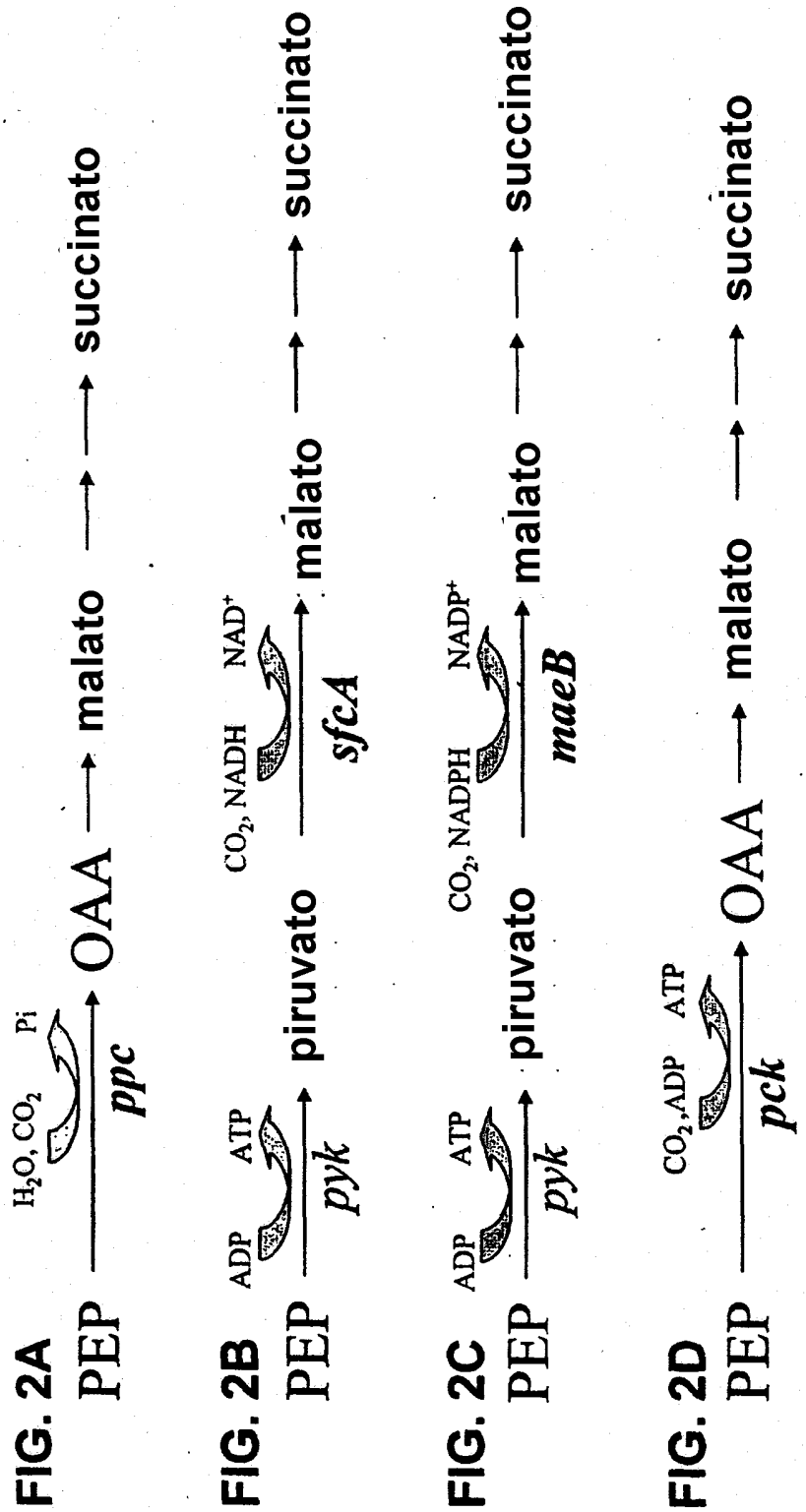
FIG. 2A
PEP
H_2O, CO_2
Pi
ppc
OAA
malato
succinato
FIG. 2B
PEP
ADP
ATP
pyk
piruvato
CO_2, NADH
NAD^+
sfcA
malato
succinato
FIG. 2C
PEP
ADP
ATP
pyk
piruvato
CO_2, NADPH
$NADP^+$
maeB
malato
succinato
FIG. 2D
PEP
CO_2, ADP
ATP
pck
OAA
malato
succinato

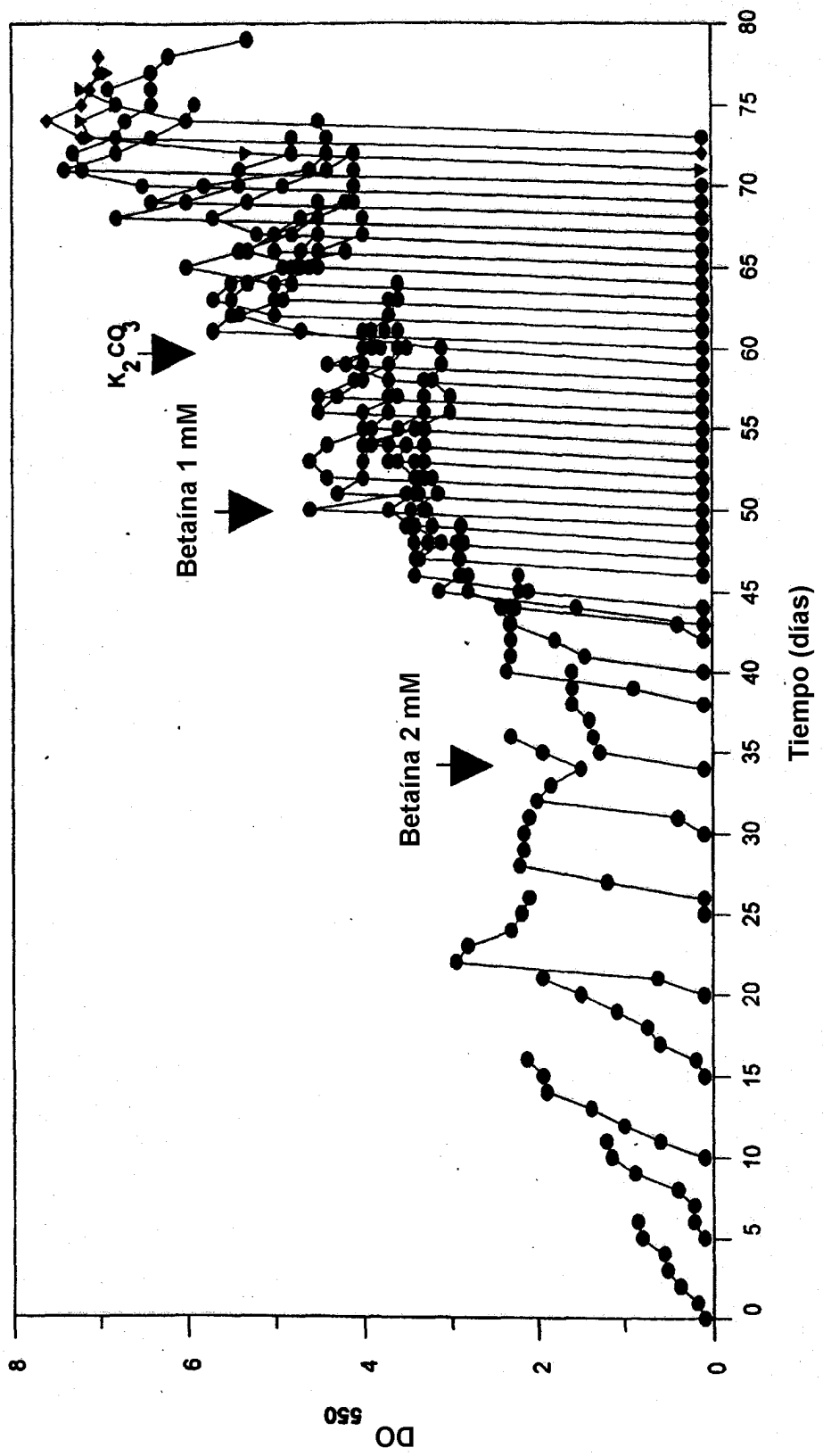
K_2CO_3
Betaína 1 mM
Betaína 2 mM
DO_{550}
Tiempo (días)
0
2
4
6
8
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80

FIG. 3A

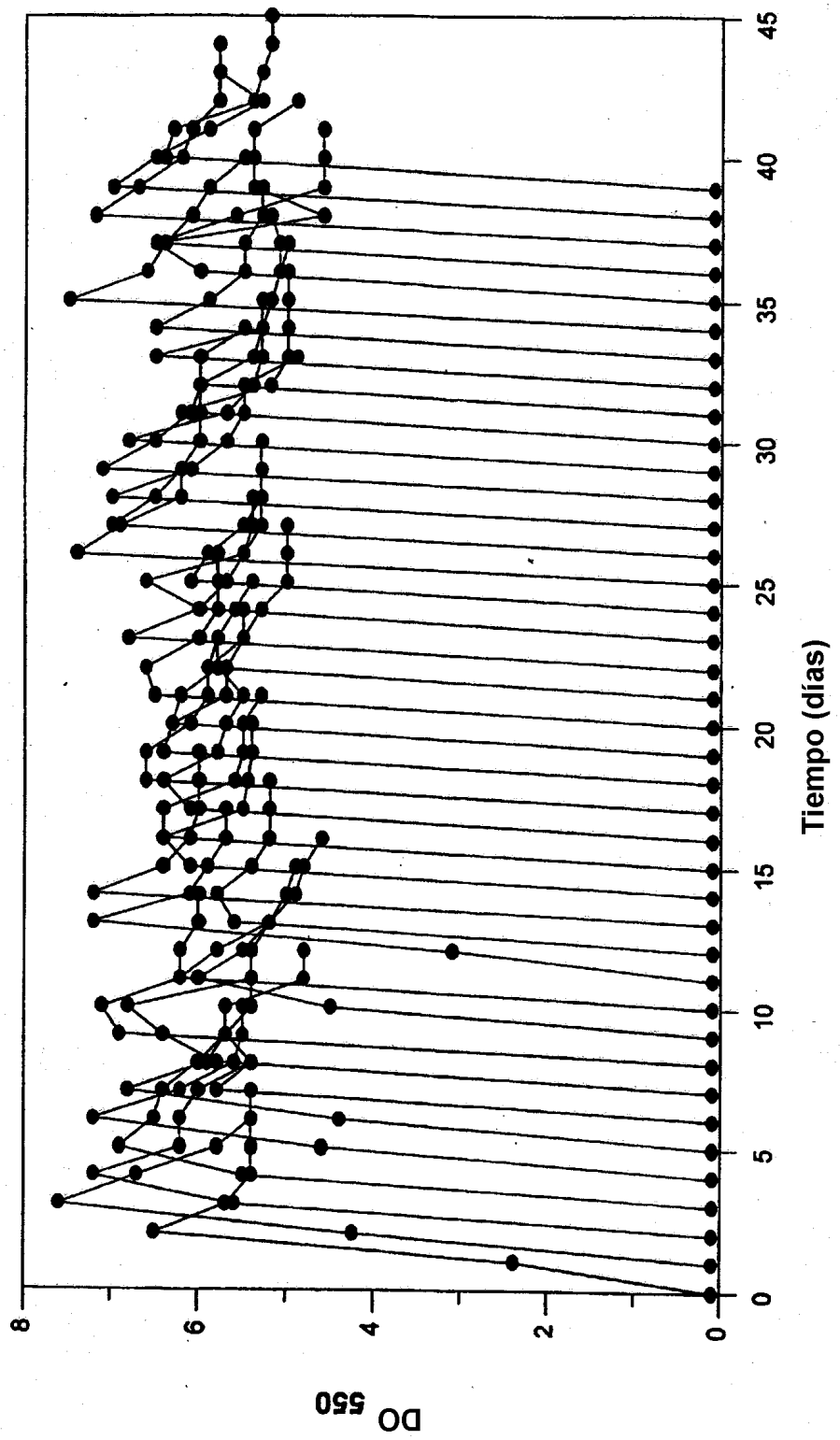

FIG. 3B

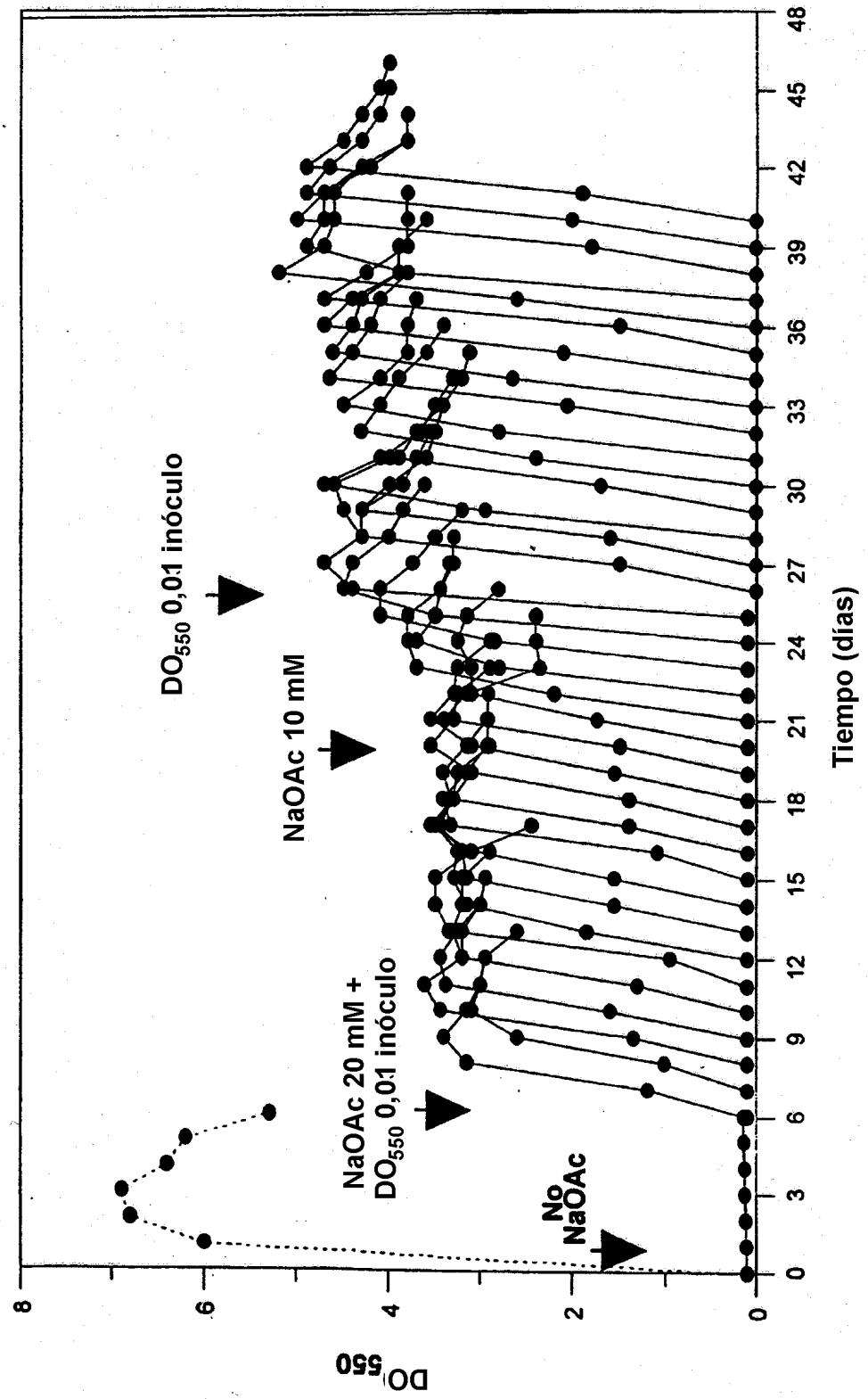
DO550
8
6
4
2
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
36
39
42
45
48
Tiempo (días)
DO550 0,01 inóculo
NaOAc 10 mM
NaOAc 20 mM +
DO550 0,01 inóculo
No
NaOAc

FIG. 3C

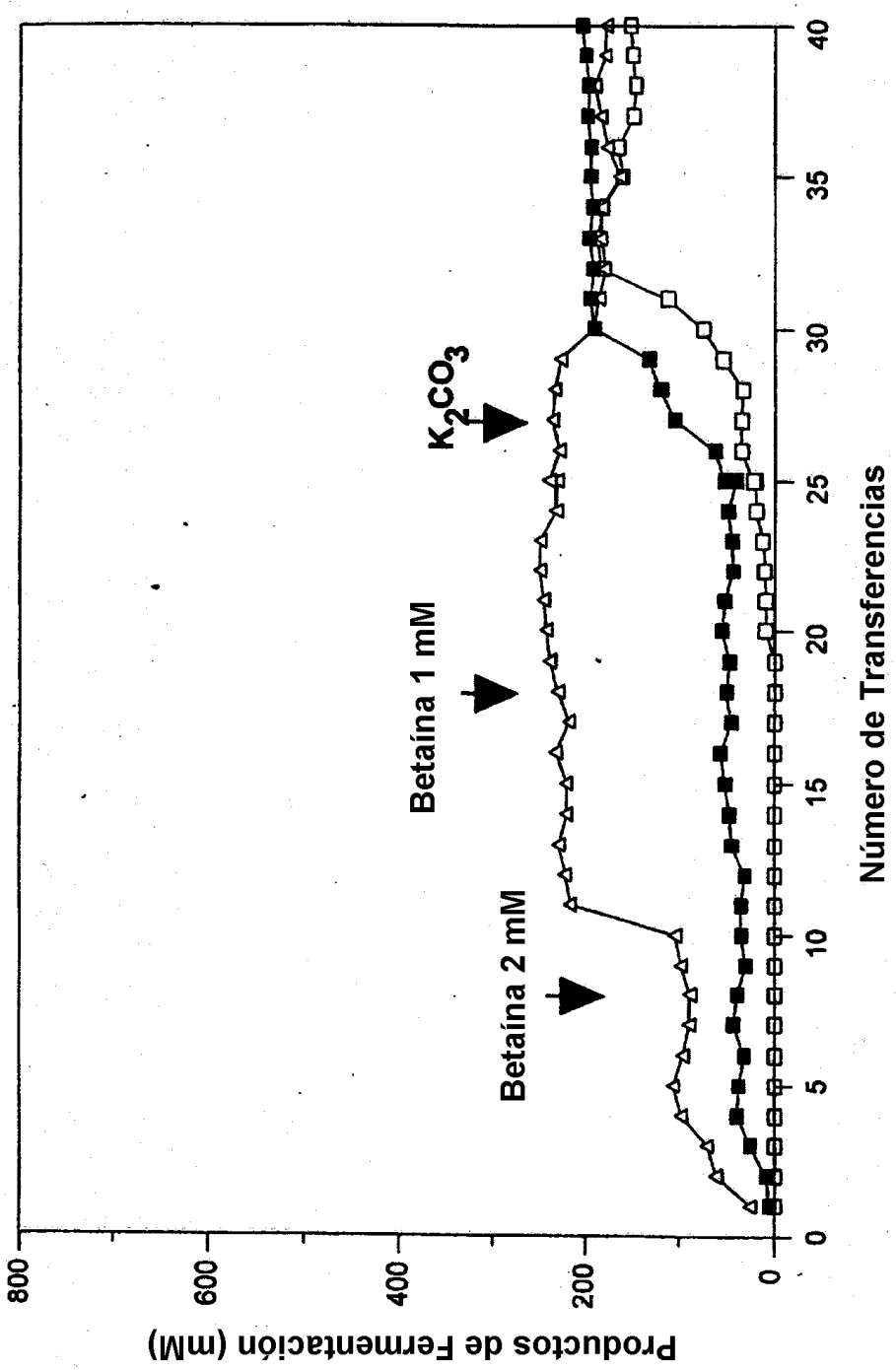
Productos de Fermentación (mM)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Número de Transferencias
Betaína 2 mM
Betaína 1 mM
K_2CO_3

FIG. 4A

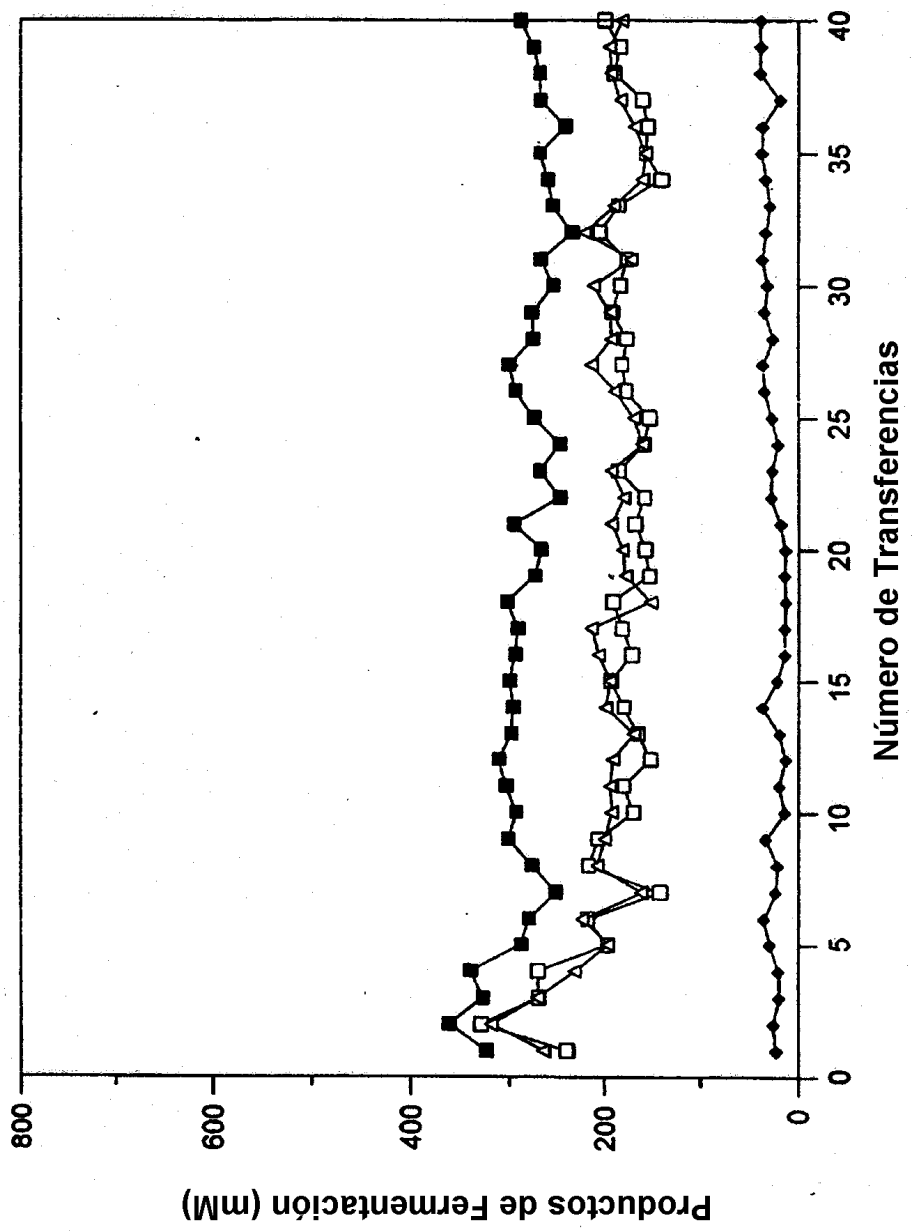
Productos de Fermentación (mM)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Número de Transferencias

FIG. 4B

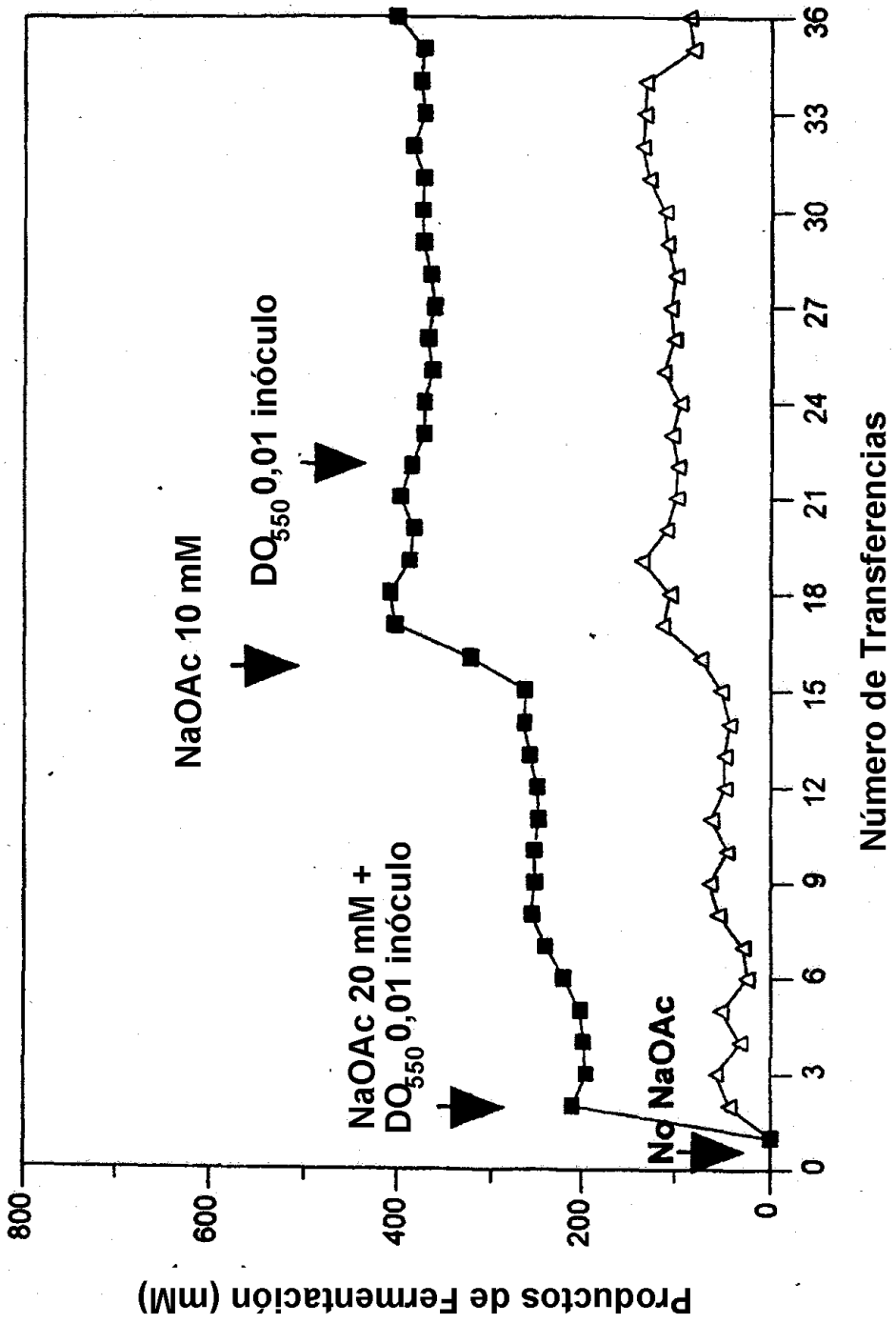
Productos de Fermentación (mM)
800
600
400
200
0
NaOAc 10 mM
DO550 0,01 inóculo
NaOAc 20 mM +
DO550 0,01 inóculo
No NaOAc
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
36
Número de Transferencias

FIG. 4C

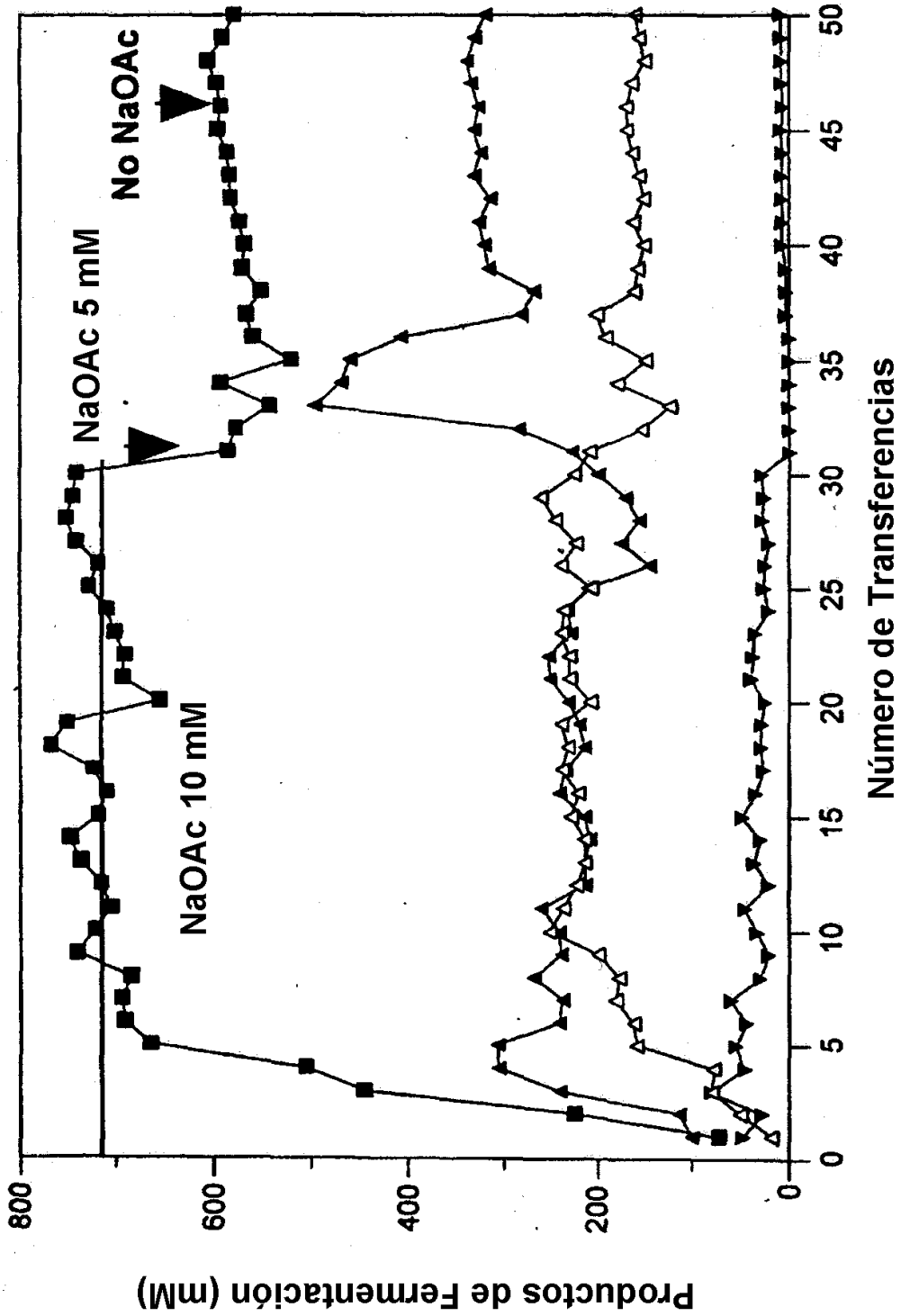
No NaOAc
NaOAc 5 mM
NaOAc 10 mM
Productos de Fermentación (mM)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Número de Transferencias

FIG. 4D

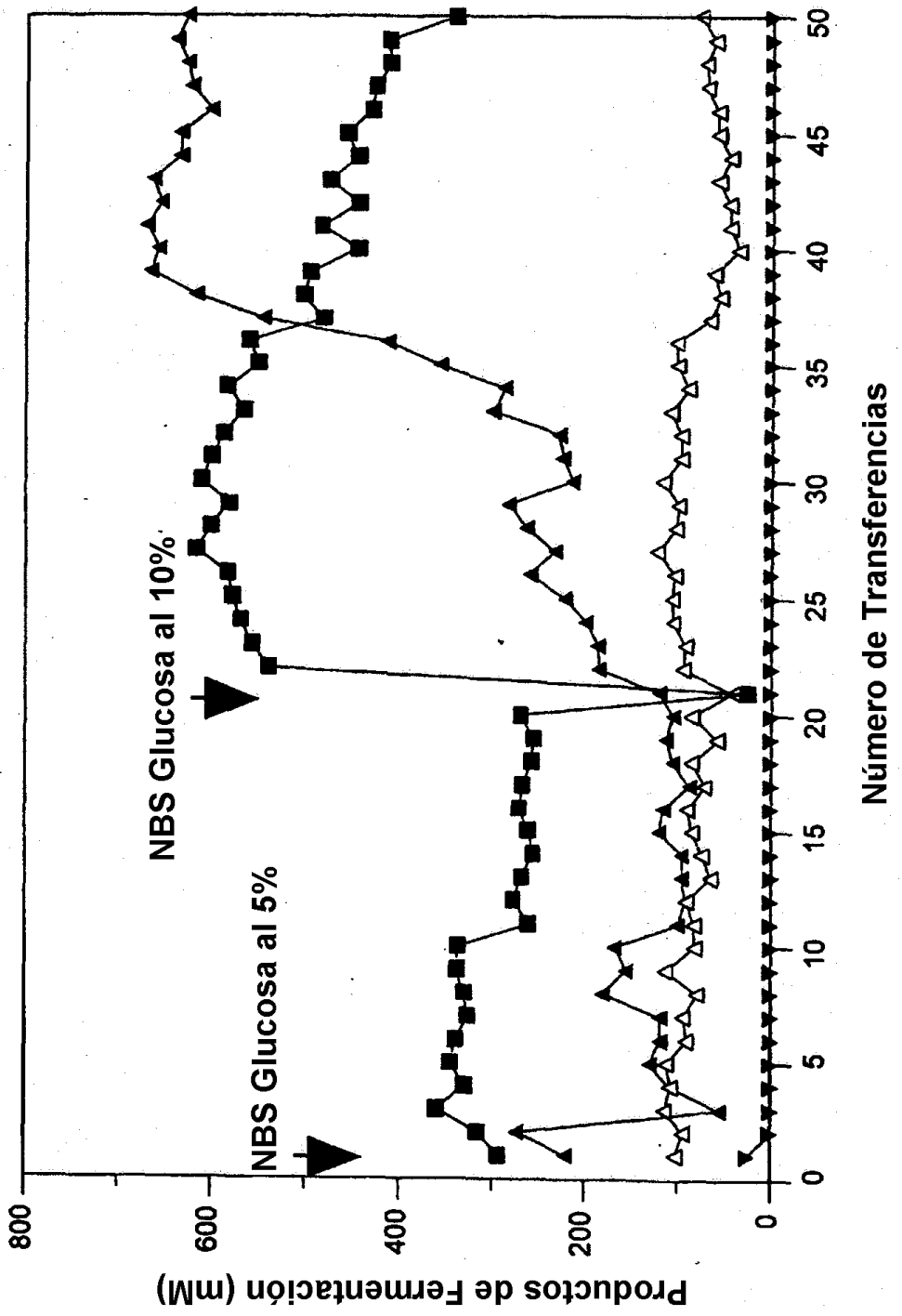
NBS Glucosa al 10%
NBS Glucosa al 5%
Productos de Fermentación (mM)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Número de Transferencias

FIG. 4E

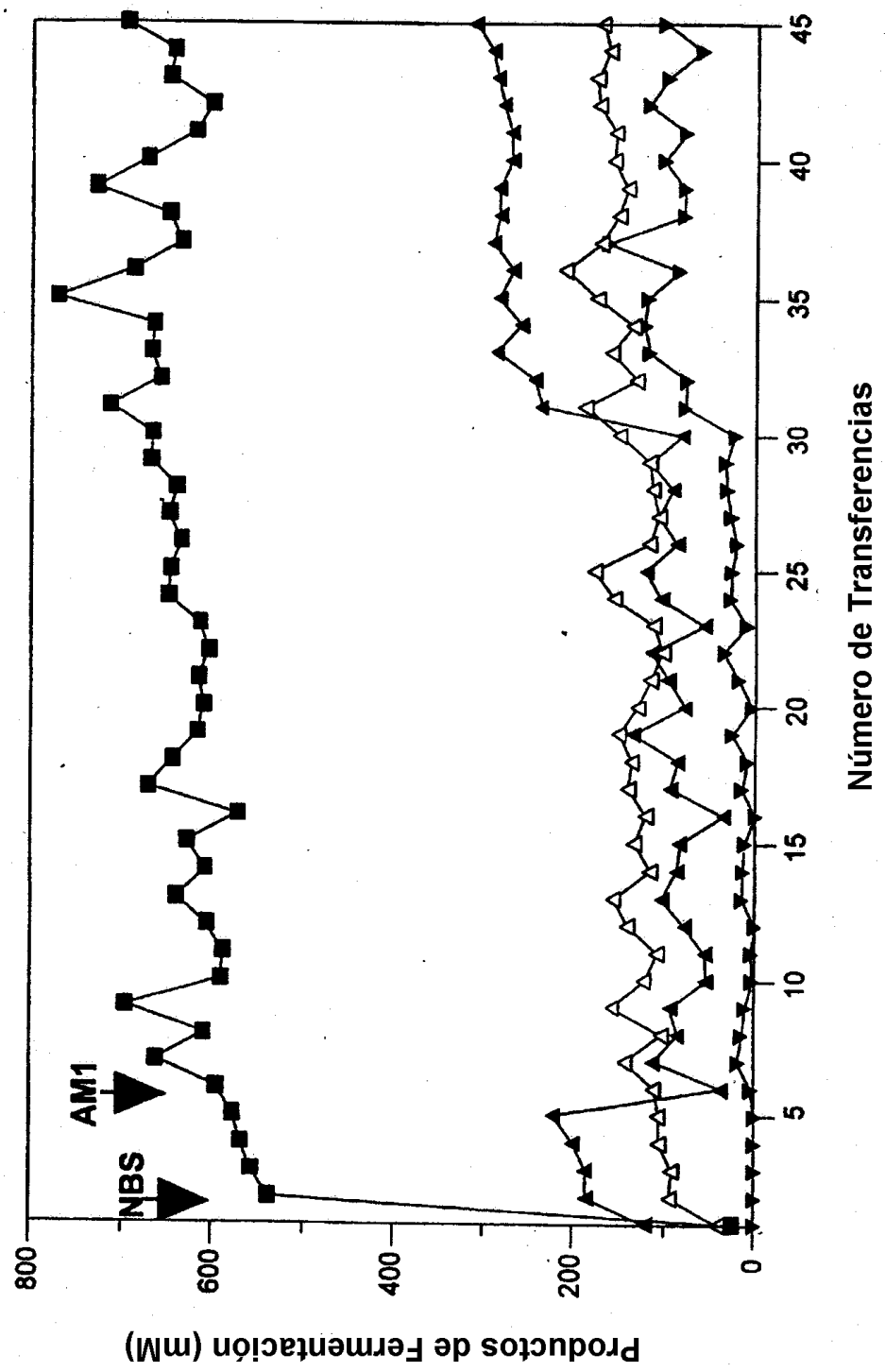
Productos de Fermentación (mM)
800
600
400
200
0
NBS
AM1
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Número de Transferencias

FIG. 4F

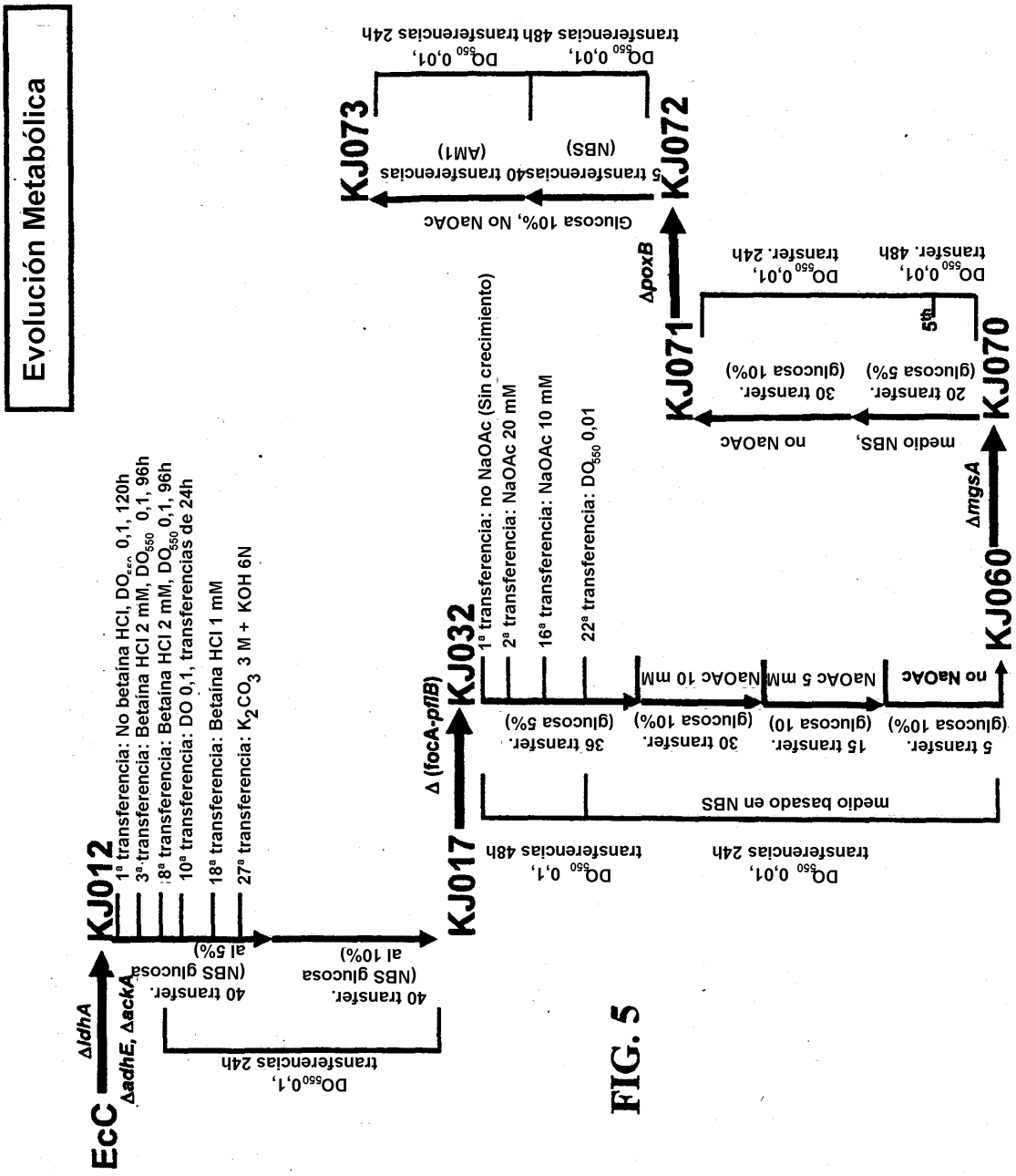
Evolución Metabólica
EcC
ΔldhA
ΔadhE, ΔackA
DO550 0,1,
transferencias 24h
KJ012
1ª transferencia: No betaína HCl, DOEcC 0,1, 120h
3ª transferencia: Betaína HCl 2 mM, DO550 0,1, 96h
8ª transferencia: Betaína HCl 2 mM, DO550 0,1, 96h
10ª transferencia: DO 0,1, transferencias de 24h
18ª transferencia: Betaína HCl 1 mM
27ª transferencia: K2CO3 3 M + KOH 6N
40 transfer. (NBS glucosa al 5%)
40 transfer. (NBS glucosa al 10%)
KJ017
DO550 0,1,
transferencias 48h
DO550 0,1,
transferencias 24h
Δ (focA-pflB)
KJ032
1ª transferencia: no NaOAc (Sin crecimiento)
2ª transferencia: NaOAc 20 mM
16ª transferencia: NaOAc 10 mM
22ª transferencia: DO550 0,01
36 transfer. (glucosa 5%)
30 transfer. (glucosa 10%)
15 transfer. (glucosa 10)
5 transfer. (glucosa 10%)
NaOAc 10 mM
NaOAc 5 mM
no NaOAc
medio basado en NBS
KJ060
ΔmgsA
medio NBS,
no NaOAc
KJ070
20 transfer. (glucosa 5%)
30 transfer. (glucosa 10%)
5th
DO550 0,01,
transfer. 48h
DO550 0,01,
transfer. 24h
KJ071
ΔpoxB
KJ072
Glucosa 10%, No NaOAc
5 transferencias (NBS)
40 transferencias (AM1)
DO550 0,01,
transferencias 48h
DO550 0,01,
transferencias 24h
KJ073

FIG. 5

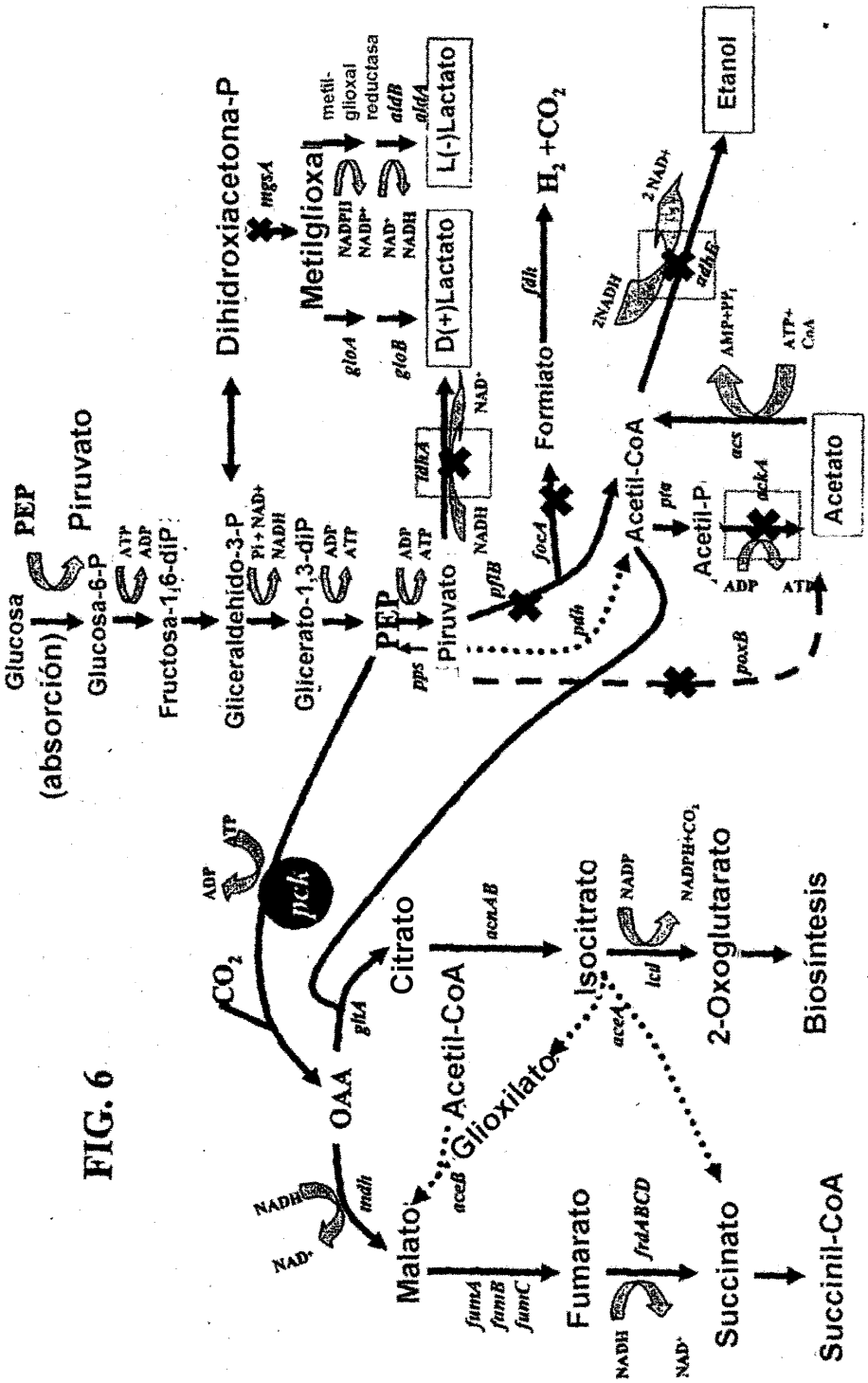
Glucosa
(absorción)
PEP
Piruvato
Glucosa-6-P
ATP
ADP
Fructosa-1,6-diP
Gliceraldehído-3-P
Pi + NAD+
NADH
Glicerato-1,3-diP
ADP
ATP
PEP
ADP
ATP
Piruvato
pps
pflB
pdh
focA
Formiato
fdh
H_2 +CO_2
Dihidroxiacetona-P
mgsA
Metilglioxal
gloA
gloB
NADPH
NADP+
NAD+
NADH
metil-
glioxal
reductasa
aldB
aldA
D(+)Lactato
L(-)Lactato
Acetil-CoA
pta
Acetil-P
ADP
ATP
ackA
Acetato
acs
AMP+PP$_i$
ATP+
CoA
2NADH
2 NAD+
adhE
Etanol
poxB
CO_2
ADP
ATP
pck
OAA
gltA
Citrato
acnAB
Isocitrato
lcd
NADP
NADPH+CO_2
2-Oxoglutarato
Biosíntesis
Acetil-CoA
Glioxilato
aceA
aceB
NADH
NAD+
mdh
Malato
fumA
fumB
fumC
Fumarato
frdABCD
NADH
NAD+
Succinato
Succinil-CoA

FIG. 6

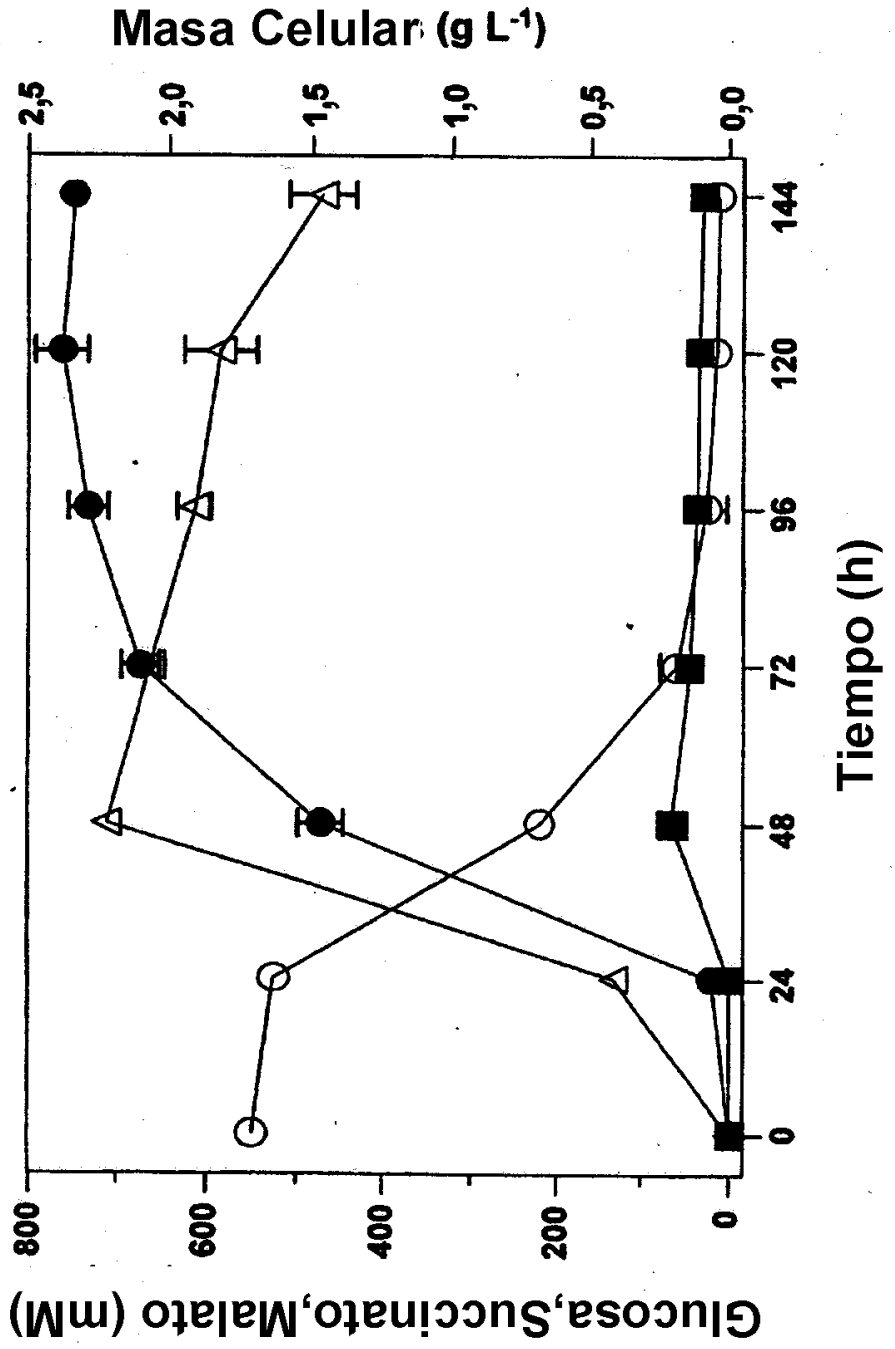
Masa Celular (g L-1)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Glucosa,Succinato,Malato (mM)
800
600
400
200
0
0
24
48
72
96
120
144
Tiempo (h)

FIG. 7A

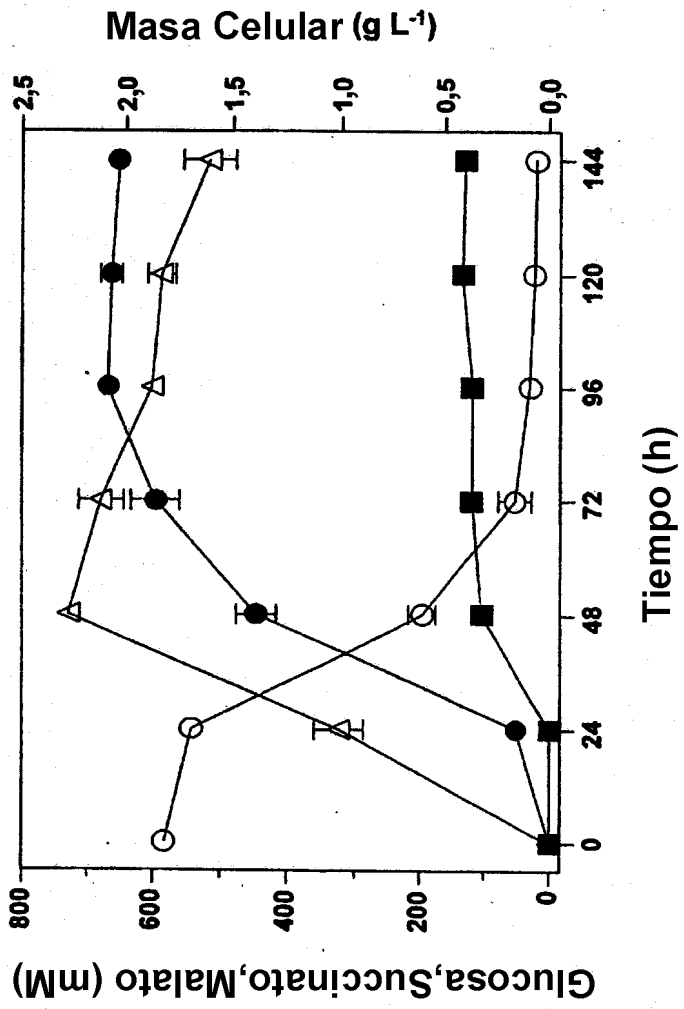
Masa Celular (g L-1)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Glucosa,Succinato,Malato (mM)
800
600
400
200
0
0
24
48
72
96
120
144
Tiempo (h)

FIG. 7B

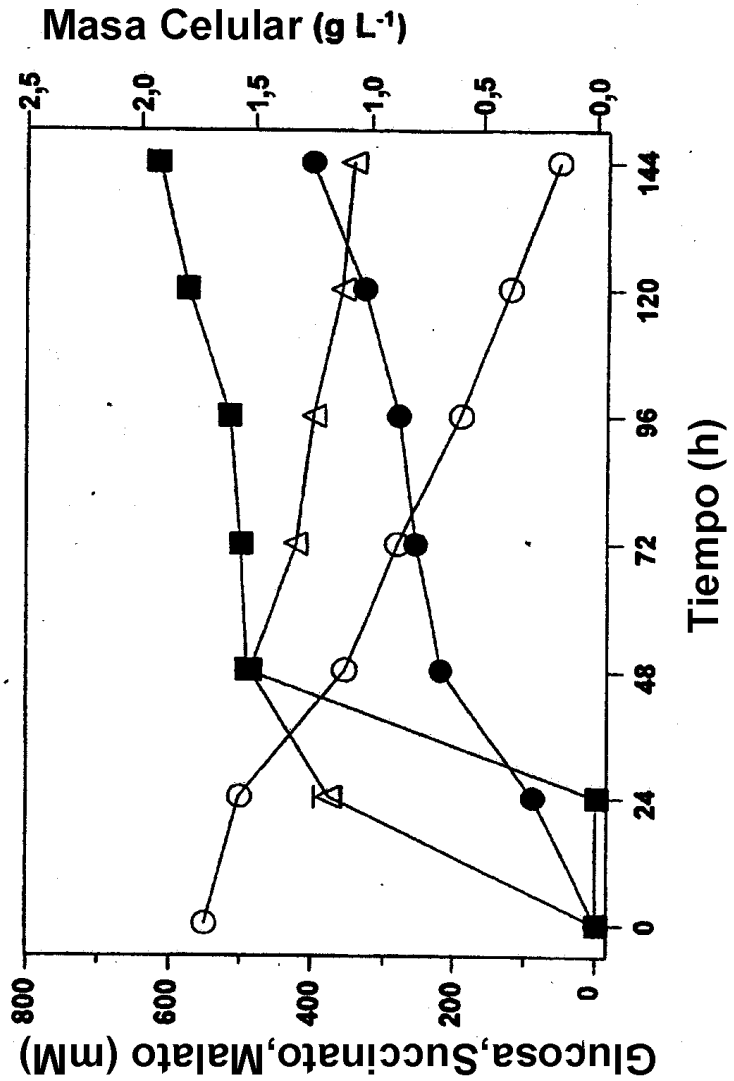
Masa Celular (g L-1)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Glucosa,Succinato,Malato (mM)
800
600
400
200
0
0
24
48
72
96
120
144
Tiempo (h)

FIG. 7C

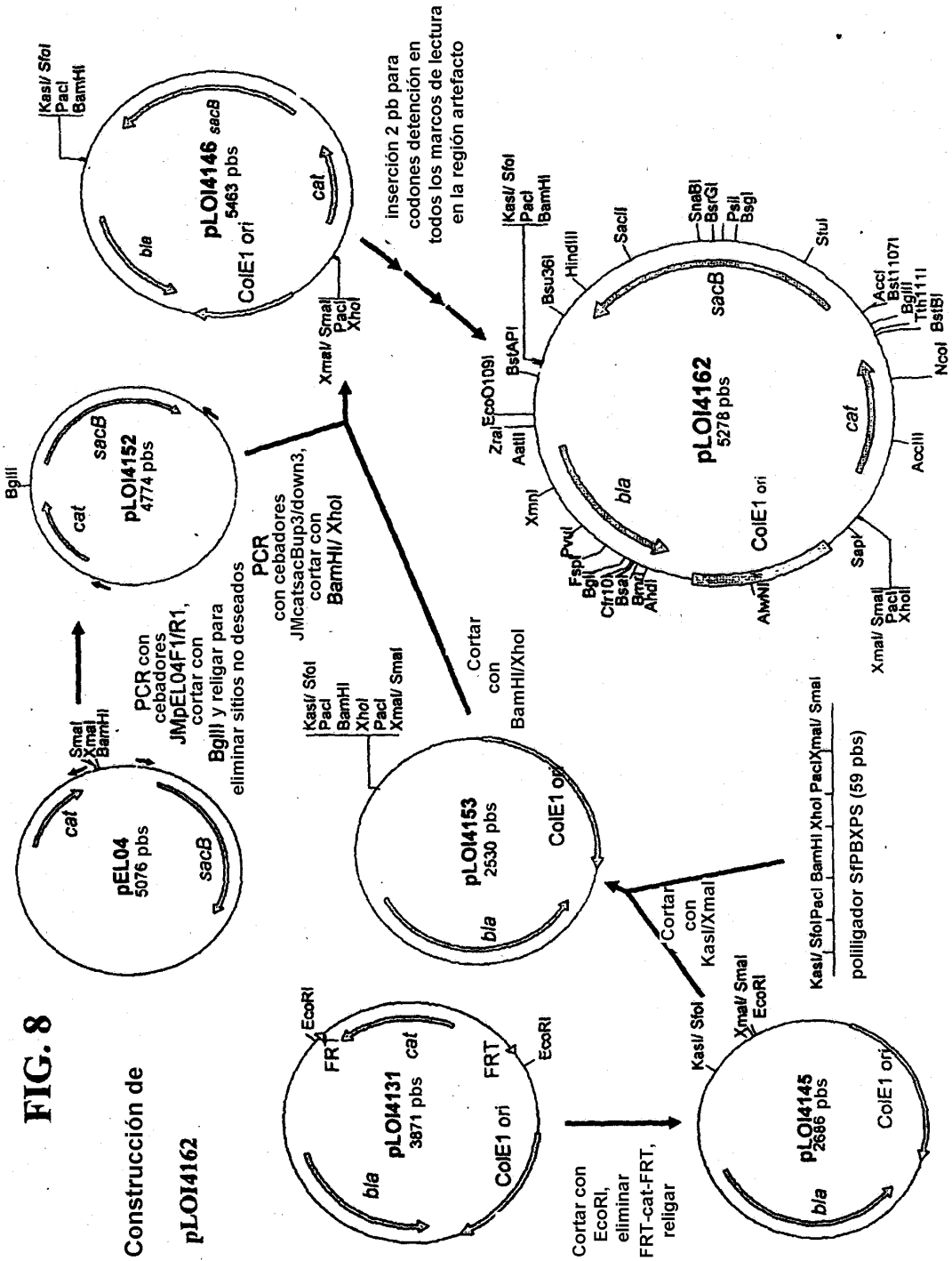
FIG. 8
Construcción de
pLOI4162
pEL04
5076 pbs
cat
sacB
SmaI
XmaI
BamHI
PCR con cebadores JMpEL04F1/R1, cortar con BglII y religar para eliminar sitios no deseados
BglII
pLOI4152
4774 pbs
cat
sacB
PCR con cebadores JMcatsacBup3/down3, cortar con BamHI/ XhoI
KasI/ SfoI
PacI
BamHI
XhoI
PacI
XmaI/ SmaI
Cortar con BamHI/XhoI
pLOI4153
2530 pbs
bla
ColE1 ori
pLOI4146
5463 pbs
bla
sacB
cat
ColE1 ori
KasI/ SfoI
PacI
BamHI
XmaI/ SmaI
PacI
XhoI
inserción 2 pb para codones detención en todos los marcos de lectura en la región artefacto
pLOI4162
5278 pbs
bla
sacB
cat
ColE1 ori
KasI/ SfoI
PacI
BamHI
Cortar con KasI/XmaI
KasI/ SfoI
PacI
BamHI
XhoI
PacI
XmaI/ SmaI
polilligador SfPBXPS (59 pbs)
pLOI4131
3871 pbs
bla
cat
FRT
FRT
EcoRI
EcoRI
ColE1 ori
Cortar con EcoRI, eliminar FRT-cat-FRT, religar
pLOI4145
2686 pbs
bla
ColE1 ori
KasI/ SfoI
XmaI/ SmaI
EcoRI

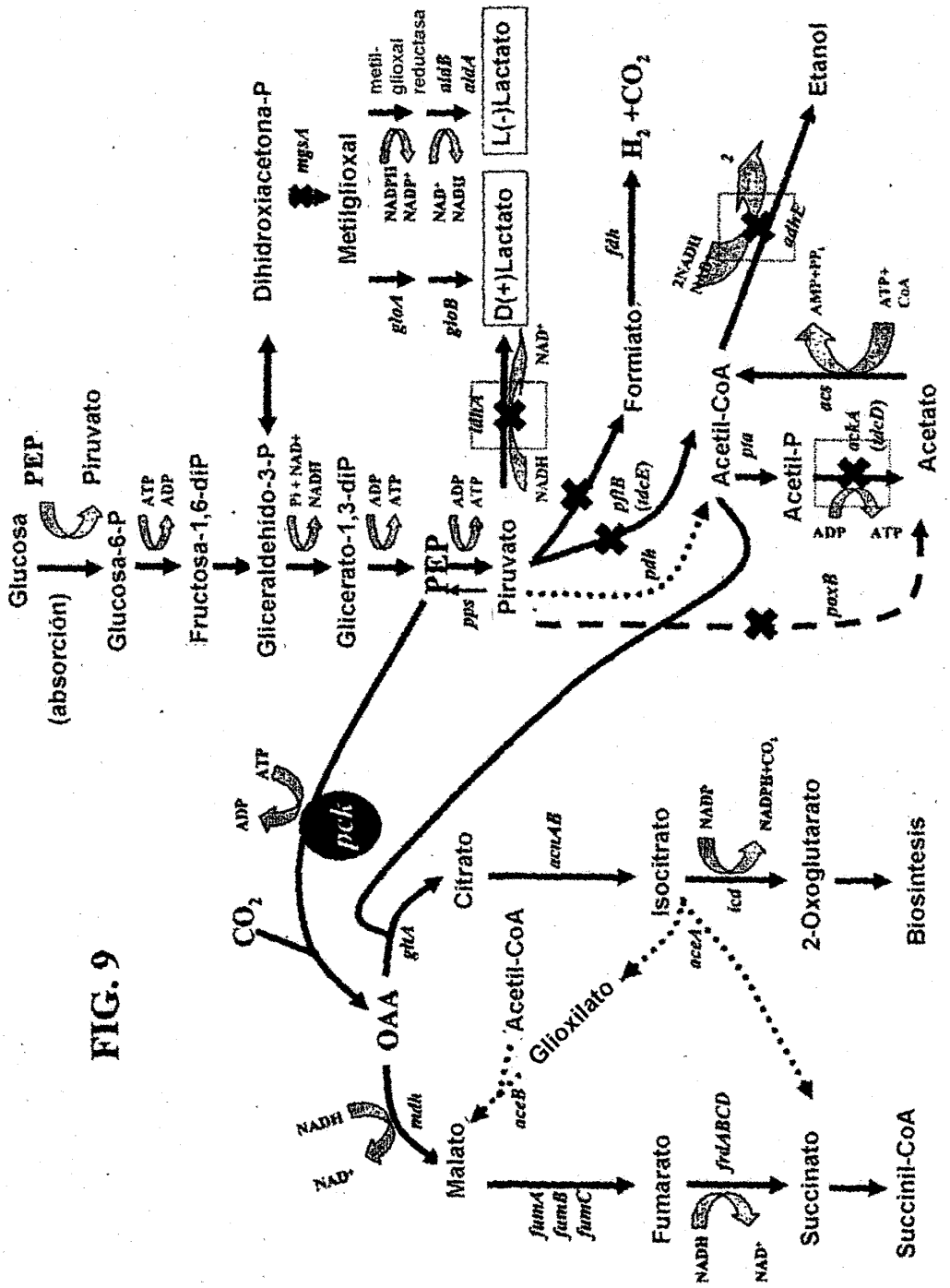
Glucosa
(absorción)
PEP
Piruvato
Glucosa-6-P
ATP
ADP
Fructosa-1,6-diP
Gliceraldehido-3-P
Pi + NAD+
NADH
Glicerato-1,3-diP
ADP
ATP
Dihidroxiacetona-P
mgsA
Metilglioxal
gloA
gloB
NADPH
NADP+
NAD+
NADH
metil-
glioxal
reductasa
aldB
aldA
D(+)Lactato
L(-)Lactato
PEP
pps
ADP
ATP
Piruvato
ldhA
NADH
NAD+
pflB
(tdcE)
pdh
Formiato
fdh
H2 +CO2
Acetil-CoA
pta
Acetil-P
ackA
(tdcD)
ADP
ATP
Acetato
acs
AMP+PPi
ATP+
CoA
2NADH
NAD+
adhE
2
Etanol
paxB
CO2
ADP
ATP
pck
OAA
gltA
Citrato
acnAB
Isocitrato
NADP
NADPH+CO2
icd
2-Oxoglutarato
Biosintesis
Acetil-CoA
Glioxilato
aceA
aceB
NADH
NAD+
mdh
Malato
fumA
fumB
fumC
Fumarato
frdABCD
NADH
NAD+
Succinato
Succinil-CoA

FIG. 9

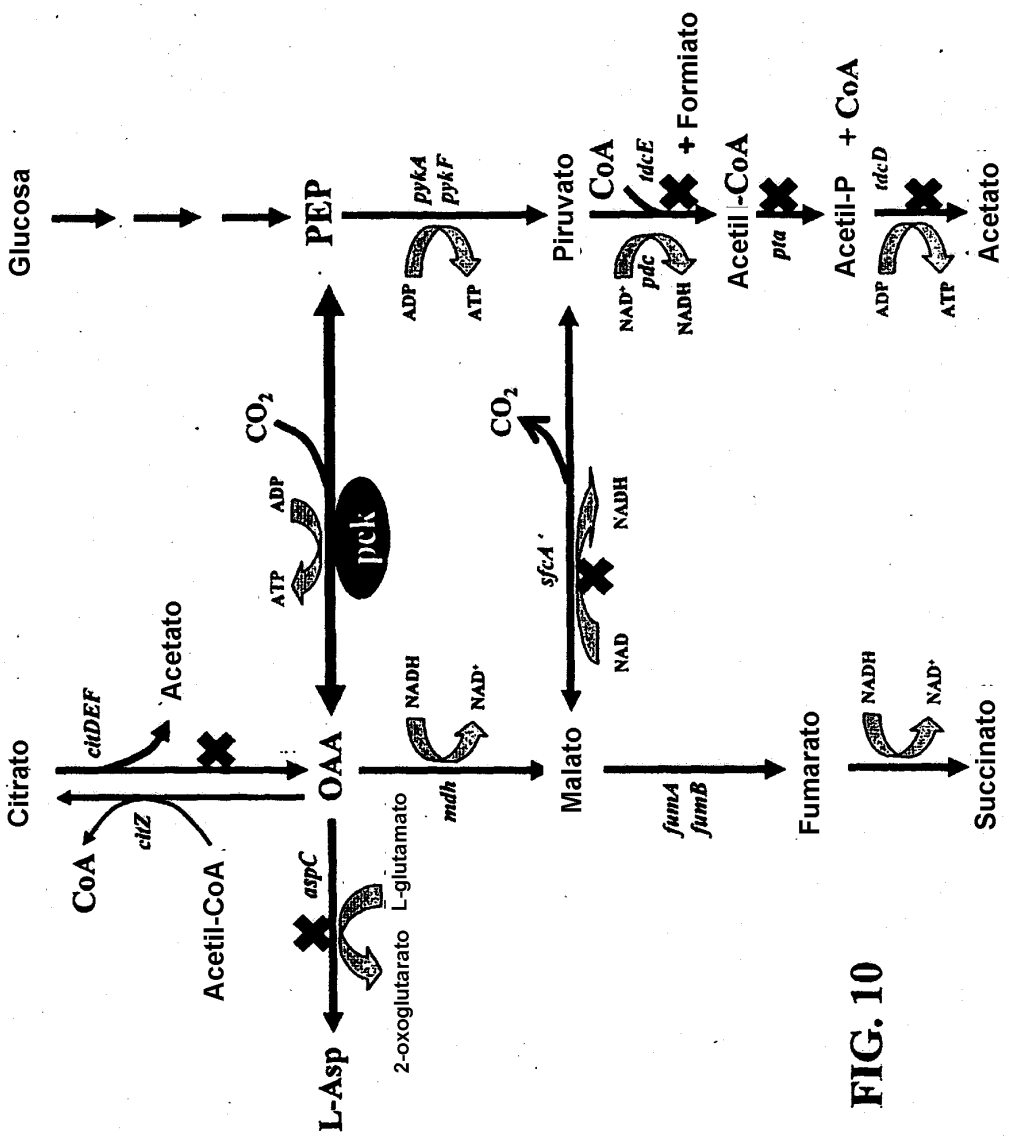
Glucosa
Citrato
CoA
Acetil-CoA
citZ
citDEF
Acetato
L-Asp
aspC
2-oxoglutarato
L-glutamato
OAA
CO2
ADP
ATP
pck
PEP
pykA
pykF
ADP
ATP
NADH
NAD+
mdh
Malato
CO2
sfcA
NAD
NADH
fumA
fumB
Fumarato
NADH
NAD+
Succinato
Piruvato
CoA
tdcE
+ Formiato
NAD+
pdc
NADH
Acetil -CoA
pta
Acetil-P + CoA
tdcD
ADP
ATP
Acetato

FIG. 10