

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 606**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12P 7/52** (2006.01)

**C12P 1/04** (2006.01)

**C12P 7/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2014 PCT/US2014/072178**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015 WO15100338**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2014 E 14875558 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3087174**

54 Título: **Métodos y organismos con mayores eficiencias del flujo de carbono**

30 Prioridad:

**27.12.2013 US 201361921292 P**  
**17.06.2014 US 201462013390 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.01.2021**

73 Titular/es:

**GENOMATICA, INC. (100.0%)**  
**4757 Nexus Center Drive**  
**San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**BURGARD, ANTHONY P.;**  
**OSTERHOUT, ROBIN E.;**  
**VAN DIEN, STEPHEN J.;**  
**PHARKYA, PRITI;**  
**YANG, TAE HOON y**  
**CHOI, JUNGIK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 800 606 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

Métodos y organismos con mayores eficiencias del flujo de carbono

### Antecedentes de la invención

5 La invención proporciona organismos microbianos no naturales que tienen un menor flujo de carbono en la conversión del succinil-CoA al succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA. La invención también proporciona métodos para reducir el flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA usando organismos microbianos.

10 La pérdida de carbono, a través de la producción excesiva de CO<sub>2</sub>, puede provenir de tres rutas principales en el metabolismo central: la ruta de la pentosa fosfato, la derivación de glioxilato y el ciclo oxidativo del ácido tricarbóxico (TCA). La principal reacción generadora de CO<sub>2</sub> de la ruta de la pentosa fosfato es la fosfogluconato deshidrogenasa. Las enzimas que pueden contribuir a la pérdida de carbono en el ciclo TCA y la derivación de glioxilato incluyen, por ejemplo, la piruvato deshidrogenasa, piruvato formiato liasa, piruvato oxidasa, alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y enzima málica.

15 La pérdida de carbono también puede provenir de otras reacciones metabólicas que incluyen, por ejemplo, el sistema de escisión de la glicina, formiato hidrogeno liasa, formiato deshidrogenasa, glutamato descarboxilasa, piruvato oxidasa, acetolactato sintasa y 2-oxo-4-metil-3-carboxipentanoato descarboxilasa, aspartato descarboxilasa, lisina descarboxilasa, diaminopimelato descarboxilasa y enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos.

20 Por lo tanto, existe la necesidad de producir medios alternativos para disminuir la pérdida de carbono y aumentar la eficiencia del flujo de carbono. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas asociadas.

### Compendio de la invención

25 La invención se refiere a un organismo microbiano no natural que comprende una modificación genética de la atenuación de *cydA* o *cydB*, y una o más de una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *pntAB*. El organismo microbiano también puede incluir la atenuación de una enzima del ciclo TCA que no sea una succinil-CoA sintetasa o transferasa. El organismo microbiano puede incluir una ruta metabólicamente diseñada para producir un compuesto bioderivado a partir de un intermedio del ciclo TCA o un sustrato del ciclo TCA. El compuesto bioderivado puede ser 4-hidroxi-butanato (4HB), 1,4-butanodiol (1,4-BDO), 1,3-butanodiol (1,3-BDO), polihidroxi-butanato (PHB), butadieno, adipato, 6-aminocaproato, caprolactama o ácido metacrílico, u otros compuestos descritos en este documento. La invención se refiere a otras modificaciones genéticas para mejorar la producción de un compuesto bioderivado.

### Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra las rutas metabólicas centrales que generan el CO<sub>2</sub>, incluyendo (1) la ruta de la pentosa fosfato; (2) el ciclo oxidativo completo de TCA; y (3) la derivación del glioxilato. Abreviaturas: Glc es glucosa, G6P es glucosa-6-fosfato, F6P es fructosa-6-fosfato, FBP es fructosa-1,6-bisfosfato, G3P es gliceraldehído-3-fosfato, PEP es fosfoenolpiruvato, Pyr es piruvato, cit es citrato, Icit es isocitrato, AKG es alfa-cetoglutarato, Succ es succinato, Fum es fumarato, Mal es malato, OAA es oxaloacetato, 6PGL es 6-fosfogluconolactona, Ru5P es ribulosa-5-fosfato, E4P es eritrosa-4-fosfato, S7P es sedoheptulosa-7-fosfato, y Glx es glioxilato.

### Descripción detallada de la invención

40 La invención proporciona organismos microbianos no naturales que tienen un menor flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA, en el que el organismo microbiano incluye una o más modificaciones genéticas. La invención también proporciona métodos para reducir el flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA usando los organismos microbianos.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "no natural", cuando se usa en referencia a un organismo microbiano o al microorganismo de la invención, pretende significar que el organismo microbiano tiene al menos una modificación genética que normalmente no se encuentra en una cepa natural de las especies de referencia, incluidas las cepas de tipo salvaje de las especies referidas. Las modificaciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácido nucleico, deleciones de ácido nucleico y / u otras modificaciones funcionales del material genético del organismo microbiano. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones codificantes y sus fragmentos funcionales para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para las especies referidas. Otras modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. Los ejemplos de polipéptidos metabólicos incluyen, por ejemplo, enzimas o proteínas que convierten el succinil-CoA en succinato, enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), piridina nucleótido transhidrogenasa, NADH deshidrogenasa, ubiquinol oxidasa, enzimas biosintéticas de

menaquinona, enzimas biosintéticas de menaquinol, fosfoenilpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fosfoenilpiruvato carboxilasa (PPC) y enzimas o proteínas dentro de una ruta biosintética de productos bioderivados.

5 Una modificación metabólica se refiere a una reacción bioquímica que se modifica partiendo de su estado natural. Por lo tanto, los microorganismos no naturales pueden tener modificaciones genéticas en los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos metabólicos, o sus fragmentos funcionales. Se describen modificaciones metabólicas ejemplares en este documento.

10 Los organismos microbianos no naturales de la invención pueden contener modificaciones genéticas estables, que se refieren a microorganismos que pueden cultivarse durante más de cinco generaciones sin pérdida de la modificación. En general, las modificaciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten más de 10 generaciones, las modificaciones particularmente estables persistirán más de aproximadamente 25 generaciones, y más particularmente, las modificaciones genéticas estables persistirán durante más de 50 generaciones, incluso indefinidamente.

15 Como se usa en el presente documento, el término "aislado", cuando se usa en referencia a un organismo microbiano, pretende significar un organismo que está sustancialmente libre de al menos un componente a medida que el organismo microbiano referenciado se encuentra en la naturaleza. El término incluye un organismo microbiano que se elimina de algunos o todos los componentes que se encuentran en su entorno natural. El término también incluye un organismo microbiano que se sustrae de algunos o de todos los componentes, ya que el organismo microbiano se encuentra en entornos no naturales. Por lo tanto, un organismo microbiano aislado se separa parcial o completamente de otras sustancias según se encontraría en la naturaleza o en cultivo, almacenado o subsistiendo en ambientes no naturales. Los ejemplos específicos de organismos microbianos aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio que no se encuentra en la naturaleza.

25 Según se usa en el presente documento, los términos "microbiano", "organismo microbiano" o "microorganismo" pretenden significar cualquier organismo que exista como una célula microscópica que esté incluida dentro de los dominios de arqueas, bacterias o eucarias. Por lo tanto, el término pretende abarcar células u organismos procariotas o eucariotas que tienen un tamaño microscópico e incluye bacterias, arqueas y eubacterias de todas las especies, así como microorganismos eucariotas como levaduras y hongos. El término también incluye cultivos celulares de cualquier especie que se pueden cultivar para la producción de un agente bioquímico.

30 Se entiende que un organismo microbiano original u organismo microbiano original, cuando se usa en referencia a un organismo microbiano que tiene una modificación génica referida u otra modificación genética, significa un organismo o cepa que tiene un genotipo sustancialmente similar al organismo microbiano que tiene la disrupción génica referida u otra modificación genética si la disrupción genética referida u otra modificación genética se excluyeran de la comparación. Por consiguiente, un organismo microbiano original se refiere a un genotipo sustancialmente similar de una cepa en la que se introduce la disrupción genética referida u otra modificación genética para generar un organismo modificado. Se entiende que un organismo microbiano original puede diferir en más de una modificación genética, ya sea por adición y / o modificación de genes, por ejemplo, dependiendo de si se están considerando modificaciones genéticas únicas o múltiples. Todo experto en la materia comprenderá fácilmente el significado de dicho organismo microbiano original en el sentido de que se considera que el organismo microbiano es un control apropiado, como se entiende en la técnica, para observar el efecto de una o más modificaciones genéticas.

40 Como se usa en el presente documento, el término "CoA" o "coenzima A" pretende significar un cofactor orgánico o grupo prostético (porción no proteica de una enzima) cuya presencia se requiere para la actividad de muchas enzimas (la apoenzima) para formar una sistema enzimático activo. La coenzima A funciona en ciertas enzimas de condensación, actúa en la transferencia del grupo acetilo u otro grupo acilo y en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, oxidación de piruvato y en otras acetilaciones.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente anaeróbico", cuando se usa en referencia a un cultivo o condición de crecimiento, pretende significar que la cantidad de oxígeno es inferior a aproximadamente 10% de saturación para el oxígeno disuelto en medios líquidos. La expresión también pretende incluir cámaras selladas de medio líquido o sólido mantenidas con una atmósfera de menos de aproximadamente 1% de oxígeno.

50 Exógeno, según se usa en el presente documento, pretende significar que la molécula referida o la actividad referida se introduce en el organismo microbiano huésped. La molécula se puede introducir, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico codificante en el material genético del huésped tal como mediante la integración en un cromosoma del huésped o como material genético no cromosómico como un plásmido. Por lo tanto, el término, tal como se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificador, se refiere a la introducción del ácido nucleico codificador en una forma expresable en el organismo microbiano. Cuando se usa en referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo de referencia del huésped. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico codificador homólogo o heterólogo que expresa la actividad referida después de la introducción en el organismo microbiano del huésped. Por lo tanto, el término "endógeno" se refiere a una molécula o actividad referida que está presente en el huésped. De manera similar, el

término, cuando se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificador, se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificador contenido dentro del organismo microbiano. El término "heterólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente distinta de la especie referida, mientras que "homólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada del organismo microbiano huésped. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico codificante de la invención puede utilizar uno o ambos ácidos nucleicos codificadores heterólogos u homólogos.

Se entiende que, cuando se incluye más de un ácido nucleico exógeno en un organismo microbiano, más de un ácido nucleico exógeno se refiere al ácido nucleico codificador o actividad biosintética referida, como se discutió anteriormente. Se entiende además, como se describe en el presente documento, que se pueden introducir más de un ácido nucleico exógeno en el organismo microbiano huésped en moléculas de ácido nucleico separadas, en moléculas de ácido nucleico policistrónico, o una combinación de las mismas, y todavía se puede considerar como más de un ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, como se describe en este documento, un organismo microbiano puede modificarse para expresar dos o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una enzima o proteína de la ruta deseada. En el caso de que dos ácidos nucleicos exógenos que codifican una actividad deseada se introduzcan en un organismo microbiano huésped, se entiende que los dos ácidos nucleicos exógenos se pueden introducir como un ácido nucleico único, por ejemplo, en un solo plásmido, en plásmidos separados, pueden integrarse en el cromosoma del huésped en un sitio único o en múltiples sitios, y aún así considerarse como dos ácidos nucleicos exógenos. De manera similar, se entiende que se pueden introducir más de dos ácidos nucleicos exógenos en un organismo huésped en cualquier combinación deseada, por ejemplo, en un solo plásmido, en plásmidos separados, se puede integrar en el cromosoma del huésped en un solo sitio o en múltiples sitios, y aún ser considerados dos o más ácidos nucleicos exógenos, por ejemplo tres ácidos nucleicos exógenos. Por lo tanto, el número de ácidos nucleicos exógenos referidos o actividades biosintéticas se refiere al número de ácidos nucleicos codificadores o al número de actividades biosintéticas, no al número de ácidos nucleicos separados introducidos en el organismo huésped.

Como se usa en el presente documento, la expresión "disrupción génica", o sus equivalentes gramaticales, pretende significar una modificación genética que hace que el producto génico codificado sea inactivo o atenuado. La modificación genética puede ser, por ejemplo, la eliminación de todo el gen, la eliminación de una secuencia reguladora requerida para la transcripción o traducción, la eliminación de una parte del gen que da como resultado un producto genético truncado, o por cualquiera de las diversas estrategias de mutación que inactivan o atenuan el producto genético codificado. Un método particularmente útil de disrupción génica es la delección génica completa porque reduce o elimina la aparición de reversiones genéticas en los microorganismos no naturales de la invención. Una disrupción genética también incluye una mutación nula, que se refiere a una mutación dentro de un gen o una región que contiene un gen que da como resultado que el gen no se transcriba en ARN y / o se traduzca en un producto génico funcional. Tal mutación nula puede surgir de muchos tipos de mutaciones que incluyen, por ejemplo, mutaciones puntuales inactivantes, delección de una porción de un gen, delecciones genéticas completas o delección de segmentos cromosómicos.

Según se usa en el presente documento, el término "atenuar", o sus equivalentes gramaticales, pretende debilitar, reducir o disminuir la actividad o cantidad de una enzima o proteína. La atenuación de la actividad o la cantidad de una enzima o proteína puede imitar la interrupción completa si la atenuación hace que la actividad o cantidad caiga por debajo del nivel crítico requerido para que una proteína o enzima determinada funcione. Sin embargo, la atenuación de la actividad o cantidad de una enzima o proteína que imita la interrupción completa para una reacción puede ser suficiente para que una reacción separada continúe funcionando. Por ejemplo, la atenuación de una enzima o proteína endógena puede ser suficiente para imitar la interrupción completa de la misma enzima o proteína para convertir succinil-CoA en succinato u otra enzima o proteína de la invención, pero la actividad o cantidad restante de enzima o proteína todavía puede ser suficiente para mantener otras reacciones, como una reacción que sea beneficiosa para el organismo microbiano del huésped para sobrevivir, reproducirse o crecer. La atenuación de una enzima o proteína también puede debilitar, reducir o disminuir la actividad o cantidad de la enzima o proteína en una cantidad que sea suficiente para reducir el flujo de carbono del succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA de la invención o debilitar, reducir o disminuir la actividad de otras enzimas o proteínas de la invención, pero no necesariamente imitar la interrupción completa de la enzima o proteína.

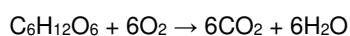
En el caso de las modificaciones genéticas, una modificación genética estable particularmente útil es una delección genética. El uso de una delección génica para introducir una modificación genética estable es particularmente útil para reducir la probabilidad de una reversión a un fenotipo antes de la modificación genética. Por ejemplo, se puede lograr una producción estable acoplada al crecimiento de un agente bioquímico, por ejemplo, mediante la eliminación de un gen que codifique una enzima que cataliza una o más reacciones dentro de un conjunto de modificaciones metabólicas. La estabilidad de la producción acoplada al crecimiento de un agente bioquímico se puede mejorar aún más a través de múltiples delecciones, reduciendo significativamente la probabilidad de que ocurran múltiples reversiones compensatorias para cada actividad interrumpida.

Según se usa en el presente documento, la expresión "enzima convertidora de succinil-CoA" significa una enzima que reconoce succinil-CoA como sustrato y puede convertir succinil-CoA en su correspondiente succinato ácido. Las enzimas convertidoras de succinil-CoA incluyen CoA hidrolasas, CoA transferasas y CoA sintetasas. Las CoA hidrolasas también se conocen en la técnica como tioesterasas y las CoA sintetasas también se conocen en la

técnica como CoA ácido-tiol ligasa. Los ejemplos de hidrolasas CoA incluyen acetil-CoA hidrolasa, succinil-CoA hidrolasa y YciA CoA hidrolasa. Ejemplos de transferasas de CoA incluyen Cat1 CoA transferasa, AarC CoA transferasa y acetoacetil-CoA transferasa. Ejemplos de sintetetasas de CoA incluyen succinato-CoA ligasa y succinil-CoA sintetasa tales como SucCD. En este documento se describen otras enzimas convertidoras de succinil-CoA ejemplares.

Según se usa en el presente documento, la expresión "enzima productora de succinato", cuando se usa en referencia a una enzima dentro de una ruta de múltiples etapas que tiene una conversión neta de succinil-CoA a succinato, significa una enzima que cataliza la etapa de conversión de succinil-CoA a succinato dentro de la ruta o una enzima que cataliza una reacción anterior a la succinil-CoA para la etapa de conversión de succinato dentro de la ruta. En consecuencia, una enzima productora de succinato, si se atenúa, daría como resultado la reducción o eliminación de la conversión de succinil-CoA en succinato dentro de una ruta de múltiples pasos referida. Ejemplos de rutas de múltiples pasos que tienen una conversión neta de succinil-CoA a succinato incluyen la degradación de arginina, la biosíntesis de lisina y rutas de biosíntesis de metionina.

Según se usa en el presente documento, la expresión "exceso de CO<sub>2</sub>" significa el CO<sub>2</sub> producido a través de la oxidación de glucosa completa, en la siguiente reacción:



En comparación, la expresión "exceso de CO<sub>2</sub>", según se usa en el presente documento, no pretende referirse al CO<sub>2</sub> que acompaña estequiométricamente la conversión de glucosa en un producto bioderivado de las invenciones o subproductos de dicha vía biosintética de ingeniería metabólica. Usando 1,4-butanodiol (1,4-BDO) con fines ilustrativos, por ejemplo, la expresión no pretende referirse al CO<sub>2</sub> producido en la siguiente reacción para la biosíntesis de 1,4-BDO:



El porcentaje del CO<sub>2</sub> en exceso se refiere al porcentaje de azúcar metabolizado en el exceso de CO<sub>2</sub>.

Según se usa en el presente documento, la expresión "de base biológica" significa un producto como se describe en el presente documento que está compuesto, en todo o en parte, de un compuesto bioderivado de la invención. Un producto de base biológica está en contraste con un producto a base de petróleo, en el que dicho producto se deriva o se sintetiza a partir de petróleo o una materia prima petroquímica.

Según se usa en el presente documento, la expresión "compuesto bioderivado" pretende significar una molécula o sustancia química diana que se deriva o sintetiza en un organismo biológico. En el contexto de la presente invención, los organismos microbianos diseñados metabólicamente se usan para producir biosintéticamente un compuesto bioderivado o intermedio del mismo a través de sustratos del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) tales como succinil-CoA, α-cetoglutarato (AKG) y acetil-CoA, incluyendo opcionalmente además a través de acetoacetil-CoA y / o malonil-CoA.

Los expertos en la materia comprenderán que las modificaciones genéticas, incluidas las modificaciones metabólicas ejemplificadas en este documento, se describen con referencia a un organismo huésped adecuado como E. coli y sus reacciones metabólicas correspondientes o un organismo fuente adecuado para el material genético deseado como genes para una ruta metabólica deseada. Sin embargo, dada la secuenciación completa del genoma de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de habilidad en el área de la genómica, los expertos en la materia podrán aplicar fácilmente las enseñanzas y el sentido proporcionados en este documento a esencialmente todos los demás organismos. Por ejemplo, las modificaciones metabólicas de E. coli ejemplificadas en este documento pueden aplicarse fácilmente a otras especies incorporando el mismo ácido nucleico codificador o análogo de especies distintas de las especies referidas. Dichas modificaciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones genéticas de homólogos de especies, en general, y en particular, ortólogos, parálogos o desplazamientos génicos no ortólogos.

Un ortólogo es un gen o genes que están relacionados por descenso vertical y que son responsables de sustancialmente las mismas o idénticas funciones en diferentes organismos. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa de ratón y la epóxido hidrolasa humana pueden considerarse ortólogos para la función biológica de la hidrólisis de epóxidos. Los genes están relacionados por descenso vertical cuando, por ejemplo, comparten una similitud de secuencia de cantidad suficiente para indicar que son homólogos, o que están relacionados por la evolución de un ancestro común. Los genes también pueden considerarse ortólogos si comparten una estructura tridimensional pero no necesariamente una similitud de secuencia, de una cantidad suficiente para indicar que han evolucionado de un ancestro común en la medida en que la similitud de la secuencia primaria no es identificable. Los genes que son ortólogos pueden codificar proteínas con una similitud de secuencia de aproximadamente 25% a 100% con la identidad de la secuencia de aminoácidos. También se puede considerar que los genes que codifican proteínas que comparten una similitud de aminoácidos inferior al 25% han surgido por descenso vertical si su estructura tridimensional también muestra similitudes. Se considera que los miembros de la familia de enzimas serina proteasa, incluidos el activador de plasminógeno tisular y la elastasa, han surgido por descendencia vertical de un ancestro común.

Los ortólogos incluyen genes o sus productos genéticos codificados que, por ejemplo, a través de la evolución, han divergido en estructura o actividad general. Por ejemplo, cuando una especie codifica un producto genético que exhibe dos funciones y en las que tales funciones se han separado en genes distintos en una segunda especie, los tres genes y sus productos correspondientes se consideran ortólogos. Para la producción de un producto bioquímico, los expertos en la materia entenderán que el gen ortólogo que alberga la actividad metabólica que se introducirá o interrumpirá se elegirá para la construcción del microorganismo no natural. Un ejemplo de ortólogos que exhiben actividades separables es aquel en el que se han separado actividades distintas en productos genéticos distintos entre dos o más especies o dentro de una sola especie. Un ejemplo específico es la separación de la proteólisis de elastasa y la proteólisis de plasminógeno, dos tipos de actividad de serina proteasa, en moléculas distintas como activador de plasminógeno y elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de la exonucleasa 5'-3' de micoplasma y la actividad de la ADN polimerasa III de *Drosophila*. La ADN polimerasa de la primera especie puede considerarse un ortólogo para una o ambas de la exonucleasa o la polimerasa de la segunda especie y viceversa.

Por el contrario, los parálogos son homólogos relacionados, por ejemplo, por la duplicación seguida de la divergencia evolutiva y tienen funciones similares o comunes, pero no idénticas. Los parálogos pueden originarse o derivarse, por ejemplo, de la misma especie o de una especie diferente. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa microsómica (epóxido hidrolasa I) y la epóxido hidrolasa soluble (epóxido hidrolasa II) pueden considerarse parálogos porque representan dos enzimas distintas, co-evolucionadas a partir de un ancestro común, que catalizan reacciones distintas y tienen funciones distintas en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con una similitud de secuencia significativa entre sí, lo que sugiere que son homólogos o están relacionados a través de la evolución conjunta de un antepasado común. Los grupos de familias de proteínas parálogas incluyen homólogos de HipA, genes de luciferasa, peptidasas y otros.

Un desplazamiento de genes no ortólogos es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituir a una función genética referida en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, poder realizar sustancialmente la misma función o una función similar en la especie de origen en comparación con la función referida en las diferentes especies. Aunque en general, un desplazamiento de genes no ortólogos será identificable como relacionado estructuralmente con un gen conocido que codifica la función referida, los genes menos relacionados estructuralmente pero funcionalmente similares y sus productos genéticos correspondientes seguirán comprendiendo el significado del término tal y como se usa en el presente documento. La similitud funcional requiere, por ejemplo, al menos alguna similitud estructural en el sitio activo o región de unión de un producto génico no ortólogo en comparación con un gen que codifica la función que se busca sustituir. Por lo tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parólogo o un gen no relacionado.

Por lo tanto, al identificar y construir los organismos microbianos no naturales de la invención que tienen un menor flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA o que tienen otras modificaciones metabólicas descritas en el presente documento, los expertos en la materia entenderán con la aplicación de la enseñanza y orientación proporcionada en este documento a una especie particular de que la identificación de modificaciones metabólicas puede incluir la identificación e inclusión o inactivación de ortólogos. En la medida en que estén presentes parálogos y / o desplazamientos de genes no ortólogos en el microorganismo referenciado que codifica una enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, los expertos en la materia también pueden utilizar estos genes relacionados evolutivamente. De manera similar para una disrupción génica, los genes relacionados evolutivamente también pueden ser modificados o eliminados en un organismo microbiano huésped para reducir o eliminar la redundancia funcional de actividades enzimáticas dirigidas a la disrupción.

Los desplazamientos génicos ortólogos, los parálogos y no ortólogos pueden determinarse por métodos reconocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la inspección de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos para dos polipéptidos revelará la identidad de secuencia y similitudes entre las secuencias comparadas. En base a tales similitudes, todo experto en la materia puede determinar si la similitud es lo suficientemente alta como para indicar que las proteínas están relacionadas a través de la evolución de un ancestro común. Algoritmos reconocidos por los expertos en la materia, como Align, BLAST, Clustal W y otros, comparan y determinan una similitud o identidad de secuencia en bruto, y también determinan la presencia o importancia de huecos en la secuencia a los que se les puede asignar un peso o una puntuación. Tales algoritmos también son conocidos en la técnica y son igualmente aplicables para determinar la similitud o identidad de la secuencia de nucleótidos. Los parámetros para una similitud suficiente para determinar la relación se calculan en base a métodos habituales para calcular la similitud estadística, o la posibilidad de encontrar una coincidencia similar en un polipéptido aleatorio, y se determina la importancia de la coincidencia. Si se desea, los expertos en la técnica también pueden optimizar visualmente una comparación por computadora de dos o más secuencias. Se puede esperar que los productos o proteínas génicos relacionados tengan una alta similitud, por ejemplo, una identidad de secuencia del 25% al 100%. Las proteínas que no están relacionadas pueden tener una identidad que sea esencialmente la misma que se esperaría que ocurriera por casualidad, si se escanea una base de datos de tamaño suficiente (aproximadamente 5%). Las secuencias entre 5% y 24% pueden o no representar una suficiente homología para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. Se puede llevar a cabo un análisis estadístico adicional para determinar la importancia de tales coincidencias dado el tamaño del conjunto de datos para determinar la relevancia de estas secuencias.

Los parámetros ejemplares para determinar la relación de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden ser como se establece a continuación. Brevemente, las alineaciones de secuencias de aminoácidos se pueden realizar utilizando BLASTP versión 2.0.8 (05 de enero de 1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0 BLOSUM62; hueco abierto: 11; extensión del hueco: 1; x\_dropoff: 50; expectativa: 10.0; tamaño de palabra: 3; filtro: activado. Las alineaciones de secuencias de ácido nucleico se pueden realizar utilizando BLASTN versión 2.0.6 (16 de septiembre de 1998) y los siguientes parámetros: Apareamiento: 1; desapareamiento: -2; hueco abierto: 5; extensión del hueco: 2; x\_dropoff: 50; valor esperado: 10,0; tamaño de palabra: 11; filtro: inactivado. Los expertos en la materia sabrán qué modificaciones pueden hacerse a los parámetros anteriores para aumentar o disminuir la rigurosidad de la comparación, por ejemplo, y determinar la relación de dos o más secuencias.

La invención se describe en este documento con referencia general a la reacción metabólica, reactivo o producto del mismo, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican una enzima asociada o catalizadora, o una proteína asociada a la reacción metabólica, reactivo referenciado o producto. A menos que se indique expresamente lo contrario en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que la referencia a una reacción también constituye una referencia a los reactivos y productos de la reacción. De manera similar, a menos que se indique expresamente lo contrario en el presente documento, la referencia a un reactivo o producto también hace referencia a la reacción, y la referencia a cualquiera de estos constituyentes metabólicos también hace referencia al gen o genes que codifican las enzimas que catalizan o las proteínas involucradas en la reacción, reactivo o producto referido, dados los habituales campos de las ciencias bioquímica metabólica, enzimología y genómica, la referencia en este documento a un gen o ácido nucleico codificante también constituye una referencia a la enzima codificada correspondiente y la reacción que cataliza o una proteína asociada con la reacción, así como los reactivos y productos de la reacción.

La invención proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa o transferasa y al menos una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o un gen que codifica una enzima productora de succinato dentro de una ruta de múltiples pasos que tiene una conversión neta de succinil-CoA a succinato. La atenuación puede ser una modificación genética. La succinil-CoA sintetasa o transferasa está codificada por un gen expuesto en las Tablas 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 o un ortólogo que tiene al menos un 70% de identidad con un gen establecido en las Tablas 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11.

Los rendimientos de los organismos microbianos diseñados metabólicamente para sintetizar productos diana a base de carbono, o compuestos bioderivados como se menciona en este documento, se pueden aumentar reduciendo la pérdida de carbono en un exceso de CO<sub>2</sub> como subproducto metabólico. Una ruta metabólica que está disponible para reducir el exceso de subproducto de CO<sub>2</sub> es el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Un punto útil en el ciclo de TCA para la intervención es la conversión de succinil-CoA en succinato que es catalizada por la succinil-CoA sintetasa. Por lo tanto, la reducción del flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA proporciona beneficios útiles.

Por ejemplo, atenuar la conversión de succinil-CoA a succinato da como resultado la reducción del exceso de subproducto de CO<sub>2</sub> producido por enzimas en etapas metabólicas posteriores en el ciclo de TCA y derivación de glioxilato, que incluyen, por ejemplo, enzima málica, piruvato deshidrogenasa, piruvato formiato liasa y piruvato oxidasa. Además, la atenuación de la conversión de succinil-CoA a succinato también da como resultado la reducción del exceso de subproducto de CO<sub>2</sub> al disminuir las rondas repetidas de flujo de carbono a través del ciclo oxidativo de TCA. La reducción de la pérdida de carbono en exceso de CO<sub>2</sub> como subproducto metabólico aumenta los rendimientos de producción de compuestos bioderivados a base de carbono porque aumenta la cantidad de carbono disponible para la biosíntesis. Una mayor disponibilidad de carbono puede aumentar los rendimientos biosintéticos de los compuestos de base biológica de todas las rutas diseñadas metabólicamente dentro de un organismo microbiano, incluidas las rutas diseñadas que dependen de un sustrato del ciclo TCA, así como aquellas que son independientes de un sustrato del ciclo TCA. Cuando un compuesto bioderivado utiliza un intermedio del ciclo TCA o sustrato anterior al succinato, la atenuación de la conversión de succinil-CoA a succinato dentro del ciclo TCA también reduce la cantidad de carbono que entra en los intermediarios del ciclo TCA posterior, aumentando así la cantidad de flujo de carbono hacia el compuesto bioderivado objetivo.

En una realización, los organismos microbianos de la invención incluyen la atenuación de dos enzimas convertoras de succinil-CoA diferentes. Una atenuación incluye una succinil-CoA sintetasa. La atenuación puede ser una modificación génica u otra modificación genética descrita en este documento o bien conocida en la técnica que da como resultado una disminución de la expresión génica o la actividad del producto génico. Tales métodos incluyen, por ejemplo, modificar un promotor, una región reguladora o un regulador de la expresión génica del gen codificador.

Las succinil-CoA sintetasas son ubicuas entre los organismos microbianos. Por ejemplo, las enzimas succinil-CoA sintetasa formadoras de ADP catalizan la conversión de succinil-CoA en succinato dentro del ciclo TCA. La atenuación de una succinil-CoA sintetasa, por lo tanto, reduce la pérdida de carbono en el subproducto de CO<sub>2</sub> y aumenta los rendimientos de los productos bioderivados. Ejemplos de enzimas succinil-CoA sintetasa formadoras de ADP están codificadas por sucCD de *E. coli* y los genes LSC1 y LSC2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Buck et al., *Biochemistry* 24: 6245-6252 (1985)). Se encuentran enzimas similares en *Mycobacterium tuberculosis*, *Homo sapiens*, *Trypanosoma brucei* y *Trichomonas vaginalis*. Los ejemplos de genes para tales enzimas succinil-CoA sintetasa formadoras de ADP de la invención se resumen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de sintetetasas de succinil-CoA formadoras de ADP

Proteína	GenBank ID	Número GI	Organismo
sucC	NP_415256.1	16128703	Escherichia coli
sucD	AAC73823.1	1786949	Escherichia coli
LSC1	NP_014785	6324716	Saccharomyces cerevisiae
LSC2	NP_011760	6321683	Saccharomyces cerevisiae
sucC	CCE36484.1	378544211	Mycobacterium tuberculosis
sucD	CCE36485.1	378544212	Mycobacterium tuberculosis
SUCLA2	NP_003841.1	11321583	Homo sapiens
SUCLG1	CAG33420.1	48146395	Homo sapiens
Tb927.3.2230	XP_843817.1	72386785	Trypanosoma brucei
Tb10.6k15.3250	XP_822976.1	71747842	Trypanosoma brucei
a-SCS2	AAC41558.1	538509	Trichomonas vaginalis
b-SCS	AAA30326.1	162521	Trichomonas vaginalis

5 Como se describe más adelante, las succinil-CoA sintetetasas distintas de las succinil-CoA sintetetasas formadoras de ADP también pueden atenuarse en los organismos microbianos de la invención como una primera atenuación de una succinil-CoA sintetetasa. Dichas succinil-CoA sintetetasas distintas de las sintetetasas formadoras de ADP se ejemplifican a continuación en la Tabla 11 y una descripción relacionada con las mismas. Por consiguiente, la invención proporciona un organismo microbiano no natural en el que una primera atenuación incluye una succinil-CoA sintetetasa. La succinil-CoA sintetetasa puede ser una succinil-CoA sintetetasa formadora de ADP que incluye, por ejemplo, sucCD o puede ser una succinil-CoA sintetetasa que no forma ADP, tal como una succinil-CoA sintetetasa formadora de GDP, o puede ser otra CoA sintetetasa que tiene actividad de succinil-CoA como se describe en este documento.

15 Los organismos microbianos de la invención también pueden incluir una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA. La segunda atenuación en un organismo microbiano de la invención puede ser una enzima convertidora de succinil-CoA distinta de la succinil-CoA sintetetasa correspondiente a la primera atenuación. Por lo tanto, las atenuaciones primera y segunda en un organismo microbiano de la invención corresponden a diferentes proteínas o enzimas. La primera atenuación se dirige a una enzima convertidora de succinil-CoA correspondiente a una sintetetasa succinil-CoA mientras que la segunda se dirige a una enzima convertidora de succinil-CoA diferente. La segunda enzima convertidora de succinil-CoA diferente puede ser una succinil-CoA sintetetasa diferente de la succinil-CoA sintetetasa correspondiente a la primera atenuación o puede ser una CoA hidrolasa o una CoA transferasa como se describe en este documento.

25 Aunque no está limitado por la teoría, en los hospedadores microbianos en los que se interrumpe una actividad enzimática, una o más enzimas endógenas pueden compensar la actividad enzimática interrumpida. Por ejemplo, los hospedadores microbianos deficientes en la actividad de succinil-CoA sintetetasa (SucCD) todavía pueden convertir succinil-CoA en succinato a través de otras enzimas endógenas. La eliminación de una enzima endógena de CoA hidrolasa, CoA transferasa o CoA sintetetasa capaz de convertir succinil-CoA en succinato puede reducir aún más la conversión de succinil-CoA en succinato, incluida la reducción del flujo del ciclo TCA completo en organismos hospedadores modificados por sucCD, y por lo tanto reducir la respiración y el exceso de generación de subproductos de CO<sub>2</sub>.

30 Hay una variedad de enzimas endógenas que convierten el succinil-CoA en succinato que puede interrumpirse para reducir la síntesis de succinato y la producción de subproductos de CO<sub>2</sub>. Por ejemplo, la conversión de succinil-CoA en succinato en un solo paso es catalizada por las enzimas CoA sintetetasa, CoA transferasa y CoA hidrolasa. La conversión de succinil-CoA a succinato puede ser la función fisiológica primaria de la enzima, como es el caso de la succinil-CoA sintetetasa de E. coli (sucCD), o puede ser una actividad secundaria. Los genes codificadores para cualquiera de estas enzimas, solos o en combinación con otras enzimas convertidoras de succinil-CoA, se pueden modificar para atenuar el ciclo de TCA y reducir la producción de subproducto de CO<sub>2</sub> en un organismo microbiano de la invención. A continuación se describen ejemplos de CoA hidrolasas, CoA-transferasas y CoA sintetetasas aplicables para su uso como segunda atenuación en los organismos microbianos de la invención, correspondientes



a un gen que codifica una enzima convertidora de succinil-CoA. La atenuación puede ser una modificación génica u otra modificación genética descrita en este documento o habitual en la técnica que dé como resultado una disminución de la expresión génica o la productividad del gen. Tales métodos incluyen, por ejemplo, modificar un promotor, una región reguladora o un regulador de la expresión génica del gen codificador.

- 5 Las enzimas CoA hidrolasa o tioesterasa están en la clase de enzimas EC 3.1.2, incluidas las succinil-CoA hidrolasas, e hidrolizan las moléculas de acil-CoA en sus ácidos correspondientes. Dichas CoA hidrolasas pueden incluirse en un organismo microbiano de la invención como una segunda atenuación de un gen que codifica una enzima convertidora de succinil-CoA.

- 10 Varias CoA hidrolasas son activas en succinil-CoA, incluidas acetil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.1), palmitoil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.2), succinil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.3) y acil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.20). Otras acetil-CoA hidrolasas que también convierten succinil-CoA en succinato incluyen acot12 del cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson et al., *Biochem. Biophys Res. Commun.* 71: 959-965 (1976)) y enzimas de *Ovis aries* y *Pisum sativum* (Zeihner et al., *Plant. Physiol* 94:20-27 (1990); Snowswell y Tubbs, *Biochem J* 171 (2): 299-303 (1978)). La tioesterasa de acil-CoA peroxisómica humana ACOT4 cataliza la hidrólisis de succinil-CoA (Hunt et al, *FASEB J*20: 1855-64 (2006); Westin et al, *J Biol Chem* 280: 38125-32 (2005)). Otra enzima con actividad succinil-CoA hidrolasa es la enzima PA5202 de *Pseudomonas aeruginosa* (Gonzalez et al, *Biochem J*445-455 (2012)). Los ejemplos de hidrolasas de CoA se resumen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Hidrolasas de CoA ejemplares

Nombre del gen	Nº de entrada GenBank	Nº GI	Organismo
tesB	NP_414986	16128437	<i>Escherichia coli</i>
acot12	NP_570103.1	18543355	<i>Rattus norvegicus</i>
ACOT4	Q3I5F7	121942509	<i>Homo sapiens</i>
ACOT4	EDL02757.1	148670810	<i>Mus musculus</i>
PA5202	NP_253889.1	15600395	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

- 20 El gen *yciA* codifica una CoA hidrolasa y se ha demostrado que hidroliza una gama de sustratos de acil-CoA que incluyen acetil-CoA, butiril-CoA, decanoil-CoA y palmitoil-CoA y succinil-CoA como se describe en este documento (véase también, por ejemplo, Zhuang et al., *Biochem* 47: 2789-96 (2008)). En una realización de la invención, los organismos microbianos con atenuación de la proteína codificada por *yciA* exhiben una disminución de la conversión de succinil-CoA en succinato dentro del ciclo TCA, lo que demuestra que *YciA* tiene actividad de succinil-CoA.
- 25 Ejemplos de enzimas *YciA* que tienen actividad succinil-CoA hidrolasa incluyen *yciA* de *E. coli* y *Haemophilus influenzae*. Los ejemplos de succinil-CoA hidrolasas se resumen a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Hidrolasas de CoA ejemplares

Nombre del gen	Nº de entrada del GenBank	Nº GI	Organismo
<i>yciA</i>	YP_005828226.1	386264733	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>yciA</i>	NP_415769.1	16129214	<i>Escherichia coli</i>

- 30 Como se describe más adelante, se observó que la actividad de succinil-CoA hidrolasa de *YciA* CoA hidrolasa disminuye sustancialmente la conversión de succinil-CoA en succinato en organismos que también tienen atenuación de una segunda enzima convertidora de succinil-CoA. Como se describe en el presente documento, aunque una modificación genética del gen que codifica la enzima del ciclo TCA succinil-CoA sintetasa (*sucCD*) que convierte la succinil-CoA en succinato resultó en una disminución de la producción de succinato, una atenuación adicional de la proteína codificada por *yciA* resultó en un aumento sustancial y reducción no aditiva en la producción de succinato a partir de succinil-CoA. Por el contrario, las atenuaciones de otras hidrolasas que también tienen actividad para acetil-CoA han dado resultados diferentes.

- 40 Las enzimas que reaccionan con una amplia gama de sustratos de acil-CoA también pueden ser activas en succinil-CoA. Por ejemplo, además de reaccionar con succinil-CoA, la enzima codificada por *acot12* del cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson et al., *Biochem. Biophys Res. Commun.* 71: 959-965 (1976)) también pueden reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA, lo que indica que las hidrolasas de CoA que tienen actividad para tioésteres de cadena media y / o larga pueden ser activas en succinil-CoA. A este respecto, la tioesterasa de ácido dicarboxílico humano, codificada por *acot8*, exhibe actividad en glutaril-CoA, adipil-CoA, suberil-CoA, sebacil-CoA y

5 dodecanodioil-CoA (Westin et al., J. Biol. Chem 280:38125-38132 (2005)). El homólogo de *E. coli* más cercano a esta enzima, *tesB*, también puede hidrolizar una gama de tioésteres de CoA de cadena media y larga (Naggert et al., J Biol Chem 266: 11044-11050 (1991)). También se ha caracterizado una enzima similar en el hígado de rata (Deana R., Biochem Int 26: 767-773 (1992)). Otras enzimas con actividad de hidrolasa CoA en *E. coli* incluyen *bioH*, *entH*, *fadM*, *frsA*, *paal*, *tesA*, *tesC*, *ybaW*, *ybfF*, *ybhC*, *ydil*, *yeiG*, *yigl*, *yiiD*, *yjfP*, *yjjU*, *ypfH*, *yqiA*, *ybgC* y *ybdB* (Kuznetsova, et al., FEMS Microbiol Rev, 2005, 29 (2): 263-279; Song et al., J Biol Chem, 2006, 281 (16): 11028-38; Guo et al., Biochemistry 48: 1712 -1722 (2009)). La mayoría de las enzimas *E. coli* anteriores se identificaron en un rastreo de alto rendimiento utilizando palmitoil-CoA como sustrato de acil-CoA (Kuznetsova et al, supra).

10 La acetil-CoA hidrolasa, ACH1, de *S. cerevisiae* representa otra hidrolasa candidata (Buu et al., J. Biol. Chem 278:17203-17209 (2003)). Otras enzimas con actividad acil-CoA hidrolasa incluyen la palmitoil-CoA hidrolasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Wang et al., Chem. Biol. 14:543-551 (2007)). Otro ejemplo de CoA hidrolasa es la glutacolato CoA-transferasa de *Acidaminococcus fermentans*. Esta enzima se transformó por mutagénesis dirigida al sitio en una hidrolasa de acil-CoA con actividad en glutaril-CoA, acetil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack et al., FEBS. 405:209-212 (1997)). Los ejemplos de CoA hidrolasas se resumen a continuación en la Tabla 4. Las CoA hidrolasas que tienen actividad succinil-CoA hidrolasa son aplicables como una enzima convertidora de succinil-CoA de la invención y, por lo tanto, pueden ser objeto de atenuación. Otras enzimas CoA hidrolasa se pueden identificar por similitud de secuencia con cualquiera de los candidatos de CoA hidrolasa descritos en este documento.

Tabla 4. CoA hidrolasas ejemplares

Nombre del gen	Nº de entrada del GenBank	Nº GI	Organismo
<i>acot8</i>	CAA15502	3191970	<i>Homo sapiens</i>
<i>acot8</i>	NP_570112	51036669	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>bioH</i>	P13001.1	115011	<i>Escherichia coli</i>
<i>entH</i>	AAC73698.1	1786813	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadM</i>	NP_414977.1	16128428	<i>Escherichia coli</i>
<i>frsA</i>	P04335.2	17865775	<i>Escherichia coli</i>
<i>paal</i>	NP_415914	16129357	<i>Escherichia coli</i>
<i>tesA</i>	NP_415027	16128478	<i>Escherichia coli</i>
<i>tesC</i>	NP_414977.1	16128428	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybaW</i>	NP_414977.1	16128428	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybfF</i>	NP_415212.1	16128662	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybhC</i>	P46130.2	2507166	<i>Escherichia coli</i>
<i>ydil</i>	NP_416201.1	16129642	<i>Escherichia coli</i>
<i>yeiG</i>	P33018.1	465595	<i>Escherichia coli</i>
<i>yigl</i>	P0ADP2.1	83288116	<i>Escherichia coli</i>
<i>yiiD</i>	P0ADQ2.1	83288127	<i>Escherichia coli</i>
<i>yjfP</i>	P39298.1	732024	<i>Escherichia coli</i>
<i>yjjU</i>	P39407.1	732119	<i>Escherichia coli</i>
<i>ypfH</i>	NP_416968.2	90111441	<i>Escherichia coli</i>
<i>yqiA</i>	Q79CP2.1	81704000	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybgC</i>	NP_415264	16128711	<i>Escherichia coli</i>
<i>ybdB</i>	NP_415129	16128580	<i>Escherichia coli</i>
ACH1	NP_009538	6319456	<i>Saccarhomyces cerevisiae</i>

Rv0098	NP_214612.1	15607240	Mycobacterium tuberculosis
gctA	CAA57199.1	559392	Acidaminococcus fermentans
gctB	CAA57200.1	559393	Acidaminococcus fermentans
gctA	ACJ24333.1	212292816	Clostridium symbiosum
gctB	ACJ24326.1	212292808	Clostridium sybiosa
gctA	NP_603109.1	19703547	Fusobacterium nucleatum
gctB	NP_603110.1	19703548	Fusobacterium nucleatum

Las CoA transferasas, incluidas las succinil-CoA transferasas, catalizan la transferencia reversible de un resto CoA de un acil-CoA a un aceptor de ácido carboxílico. Se ha demostrado que las enzimas CoA transferasas en las clases de EC enumeradas a continuación en la Tabla 5 catalizan la conversión de succinil-CoA en succinato.

5 Tabla 5. Ejemplos de CoA transferasas

Número EC	Nombre de la enzima
2.8.3.2	oxalato CoA-transferasa
2.8.3.5	3-oxoácido CoA-transferasa
2.8.3.6	3-oxoadipato CoA-transferasa
2.8.3.7	succinato-citramalato CoA-transferasa
2.8.3.8	acetato CoA-transferasa
2.8.3.13	Succinato: hidroximetilglutarato CoA transferasa
2.8.3.15	Succinil-CoA : bencilsuccinato CoA transferasa
2.8.3.16	Formil-CoA transferasa

10 Por ejemplo, se ha demostrado que los productos génicos de *cat1*, *cat2* y *cat3* de *Clostridium kluveri* exhiben actividad de succinil-CoA, 4-hidroxibutiril-CoA y butiril-CoA transferasa, respectivamente (Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A 105: 2128-2133 (2008); Sohling et al., J Bacteriol. 178:871-880 (1996)). La actividad de la succinil-CoA transferasa también está presente en *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei*, *Clostridium aminobutyricum* y *Porphyromonas gingivalis* (Riviere et al., J. Biol. Chem 279: 45337-45346 (2004); van Grinsven et al., J. Biol. Chem 283:1411-1418 (2008)). *Acetobacter acetii* utiliza una succinil-CoA: acetato CoA transferasa para completar su ciclo TCA inusual (Mullins et al. J Bacteriol 190: 4933-40 (2008)). Ejemplos de succinil-CoA transferasas se resumen a continuación en la Tabla 6.

15 Tabla 6. CoA transferasas ejemplares

Proteína	GenBank ID	Número GI	Organismo
<i>cat1</i>	P38946.1	729048	<i>Clostridium kluveri</i>
<i>cat2</i>	P38942.2	172046066	<i>Clostridium kluveri</i>
<i>cat3</i>	EDK35586.1	146349050	<i>Clostridium kluveri</i>
ASCT	XP_001330176	123975034	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	<i>Trichomonas brucei</i>
<i>cat2</i>	CAB60036.1	6249316	<i>Clostridium aminobutyricum</i>
<i>cat2</i>	NP_906037.1	34541558	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83

AarC	AGG68324.1	459463669	Acetobacter aceti
------	------------	-----------	-------------------

Otras transferasas también pueden exhibir actividad succinil-CoA transferasa y son aplicables para el reconocimiento como una atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA de la invención. Por ejemplo, una acil-CoA transferasa grasa que utiliza acetil-CoA como donante de CoA es la acetoacetil-CoA transferasa, codificada por los genes *E. coli* *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* (subunidad beta) (Korolev et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel et al., 33: 902-908 (1968)). Esta enzima tiene un amplio rango de sustratos en sustratos de longitud de cadena C3-C6 (Sramek et al., Arch Biochem Biophys 171: 14-26 (1975)) y se ha demostrado que transfiere el resto CoA a acetato a partir de una variedad de sustratos ramificados y lineales de 3-oxo y acil-CoA (Matthies et al., Appl Environ. Microbiol 58: 1435-1439 (1992); (Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys Res. Commun. 33:902-908 (1968); Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908 (1968)). Existen enzimas similares en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan et al., 68: 5186-5190 (2002)), *Clostridium acetobutylicum* (Cary et al., Appl Environ Microbiol 56: 1576-1583 (1990); Wiesenborn et al., Appl Environ Microbiol 55: 323-329 (1989), y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:58-68 (2007)). Estas CoA transferasas ejemplares son aplicables para la atenuación como una enzima convertidora de succinil-CoA de la invención. Los ejemplos de CoA transferasas se resumen a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. CoA transferasas ejemplares

Gen	Nº GI	Nº de entrada	Organismo
<i>atoA</i>	2492994	P76459.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>atoD</i>	2492990	P76458.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>actA</i>	62391407	YP_226809.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>cg0592</i>	62389399	YP_224801.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>ctfA</i>	15004866	NP_149326.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfB</i>	15004867	NP_149327.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>ctfA</i>	31075384	AAP42564.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ctfB</i>	31075385	AAP42565.1	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

*YgfH* codifica una propionil CoA: succinato CoA transferasa en *E. coli* (Haller et al., Biochemistry, 39 (16) 4622-4629). Se pueden encontrar homólogos cercanos en, por ejemplo, *Citrobacter youngae* ATCC 29220, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* serovar y *Yersinia intermedia* ATCC 29909. Estas proteínas se identifican a continuación. Las enzimas formil-CoA transferasa de *E. coli* (*yfdW*) y *Oxalobacter formigenes* (*frc*) pueden usar succinil-CoA como donante de CoA (Sidhu et al, J Bacteriol 3378-81 (1997); Toyota et al, J Bacteriol 190: 7 (2008)). Otras CoA transferasas en *E. coli* que pueden catalizar la conversión de succinil-CoA en succinato incluyen *yfdW*, *yrdE*, *caiB* y *ydiF*. Dichas CoA transferasas ejemplares adicionales son aplicables para la atenuación como una enzima convertidora de succinil-CoA de la invención. Los ejemplos de CoA transferasas se resumen a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8. Ejemplos de CoA transferasas

Proteína	GenBank ID	Número GI	Organismo
<i>ygfH</i>	NP_417395.1	16130821	<i>Escherichia coli</i>
CIT292_04485	ZP_03838384.1	227334728	<i>Citrobacter youngae</i>
SARI_04582	YP_001573497.1	161506385	<i>Salmonella enterica</i>
<i>yinte0001_14430</i>	ZP_04635364.1	238791727	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>frc</i>	O06644	21542067	<i>Oxalobacter formigenes</i>
<i>yfdW</i>	NP_416875.1	16130306	<i>Escherichia coli</i>

yfdE	NP_416872.4	162135906	Escherichia coli
caiB	NP_414580.1	16128032	Escherichia coli
ydiF	NP_416209.1	16129650	Escherichia coli

Las enzimas succinil-CoA: 3: oxoácido-CoA transferasa (SCOT) también catalizan la conversión de succinil-CoA en succinato. Las enzimas de esta clase están codificadas por pcal y pcaJ en *Pseudomonas putida* (Kaschabek et al., J Bacteriol. 184:207-215 (2002)). Enzimas similares se encuentran en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Kowalchuk et al., Gene 146: 23-30 (1994)), *Streptomyces coelicolor* y *Pseudomonas knackmussii* (anteriormente sp. B13) (Gobel et al., J Bacteriol. 184:216-223 (2002); Kaschabek et al., J Bacteriol. 184:207-215 (2002)). Otros ejemplos de succinil-CoA: 3: oxoácido-CoA transferasas se han caracterizado en *Helicobacter pylori* (Corthesy-Theulaz et al., J Biol. Chem 272:25659-25667 (1997)), *Bacillus subtilis* (Stols et al., Protein Expr. Purif. 53:396-403 (2007)) *Sus scrofa* y *Homo sapiens* (Fukao, T., et al., Genomics 68: 144-151 (2000); Tanaka, H., et al., Mol Hum Reprod 8: 16-23 (2002)). Por consiguiente, estas CoA transferasas ejemplares son aplicables para la atenuación como una enzima convertidora de succinil-CoA de la invención. Los ejemplos de CoA transferasas se resumen a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9. CoA transferasas ejemplares

Gen	Nº GI	Nº entrada	Organismo
pcaI	24985644	AAN69545.1	<i>Pseudomonas putida</i>
pcaJ	26990657	NP_746082.1	<i>Pseudomonas putida</i>
pcaI	50084858	YP_046368.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
pcaJ	141776	AAC37147.1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
pcaI	21224997	NP_630776.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
pcaJ	21224996	NP_630775.1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
catI	75404583	Q8VPF3	<i>Pseudomonas knackmussii</i>
catJ	75404582	Q8VPF2	<i>Pseudomonas knackmussii</i>
HPAG1_0676	108563101	YP_627417	<i>Helicobacter pylori</i>
HPAG1_0677	108563102	YP_627418	<i>Helicobacter pylori</i>
ScoA	16080950	NP_391778	<i>Bacillus subtilis</i>
ScoB	16080949	NP_391777	<i>Bacillus subtilis</i>
OXCT1	NP_000427	4557817	<i>Homo sapiens</i>
OXCT2	NP_071403	11545841	<i>Homo sapiens</i>
SCOT	Q29551.2	395398464	<i>Sus scrofa</i>

Muchas transferasas tienen una amplia especificidad y, por lo tanto, pueden utilizar aceptores de CoA tan diversos como acetato, succinato, propionato, butirato, 2-metilacetato, 3-cetohexanoato, 3-cetopentanoato, valerato, crotonato, 3-mercaptopropionato, propionato, vinilacetato, butirato, entre otros. Por ejemplo, se demostró que una enzima de *Roseburia* sp. A2-183 tenía actividad butiril-CoA: acetato: CoA transferasa y propionil-CoA: acetato: CoA transferasa (Charrier et al., Microbiology 152, 179-185 (2006)). Se pueden encontrar homólogos cercanos, por ejemplo, en *Roseburia intestinalis* L1-82, *Roseburia inulinivorans* DSM 16841, *Eubacterium rectale* ATCC 33656. Otra enzima con actividad propionil-CoA transferasa se puede encontrar en *Clostridium propionicum* (Selmer et al., Eur J Biochem 269, 372-380 (2002)). Esta enzima puede usar acetato, (R)-lactato, (S)-lactato, acrilato y butirato como aceptor de CoA (Selmer et al., Eur J Biochem 269, 372-380 (2002); Schweiger y Buckel, FEBS Letters 171 (1) 79-84 (1984)). Se pueden encontrar homólogos cercanos, por ejemplo, en *Clostridium novyi* NT, *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 y *Clostridium botulinum* C str. Eklund. YgfH codifica una propionil CoA: succinato CoA transferasa en *E. coli* (Haller et al., Biochemistry, 39 (16) 4622-4629). Se pueden encontrar homólogos cercanos, por ejemplo, en *Citrobacter youngae* ATCC 29220, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* serovar y *Yersinia intermedia*

ATCC 29909. Las CoA transferasas que tienen actividad succinil-CoA transferasa son aplicables como una enzima convertidora de succinil-CoA de la invención y, por lo tanto, pueden ser objeto de atenuación. Los ejemplos de CoA transferasas se resumen a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. CoA transferasas ejemplares

Proteína	GenBank ID	Número GI	Organismo
Achl	AAX19660.1	60396828	Roseburia sp. A2-183
ROSINTL182_07121	ZP_04743841.2	257413684	Roseburia intestinalis
ROSEINA2194_03642	ZP_03755203.1	225377982	Roseburia inulinivorans
EUBREC_3075	YP_002938937.1	238925420	Eubacterium rectale
pct	CAB77207.1	7242549	Clostridium propionicum
NT01CX_2372	YP_878445.1	118444712	Clostridium novyi NT
Cbei_4543	YP_001311608.1	150019354	Clostridium beijerinckii
CBC_A0889	ZP_02621218.1	168186583	Clostridium botulinum

5

CoA ácido-tiol ligasa o CoA sintetasa aparecen en la clase 6.2.1 de enzimas, incluidas las succinil-CoA sintetetas, y catalizan la conversión de sustratos de acil-CoA en sus productos ácidos. Como se describió anteriormente, un gen que codifica una CoA sintetasa se puede utilizar como una primera atenuación correspondiente a una succinil-CoA sintetasa o como segunda atenuación correspondiente a una enzima convertidora de succinil-CoA en un organismo microbiano de la invención. Se describen ejemplos de sintetetas de CoA aplicables para la atenuación en un organismo microbiano de la invención (véase la Tabla 1 y la descripción correspondiente). A continuación se describen otras sintetetas de CoA ejemplares aplicables para la atenuación en un organismo microbiano de la invención.

10

Las sintetetas de CoA que convierten ATP o GTP en ADP o GDP son reversibles y pueden catalizar la conversión de succinil-CoA en succinato. Las enzimas formadoras de AMP catalizan la activación de un ácido a un acil-CoA. Las enzimas CoA sintetasa para convertir succinil-CoA en succinato incluyen succinato-CoA ligasa (formación de GDP, EC 6.2.1.4), succinato-CoA ligasa (formación de ADP, EC 6.2.1.5) y acetato-CoA ligasa (formación de ADP, EC 6.2.1.13).

15

Otra CoA sintetasa aplicable para la atenuación como una succinil-CoA sintetasa o como una enzima convertidora de succinil-CoA incluye acetil-CoA sintetasa formadora de ADP (ACD, EC 6.2.1.13). Esta CoA sintetasa es una enzima que combina la conversión de los ésteres de acil-CoA en sus ácidos correspondientes con la síntesis concomitante de ATP.

20

Las enzimas succinil-CoA sintetasa formadoras de ADP se ejemplifican en este documento (véase la Tabla 1 y la descripción correspondiente). Brevemente, estas succinil-CoA sintetetas están codificadas por sucCD de *E. coli* y los genes LSC1 y LSC2 de *Saccharomyces cerevisiae* y enzimas similares se encuentran en *Mycobacterium tuberculosis*, *Homo sapiens*, *Trypanosoma brucei* y *Trichomonas vaginalis* (Tabla 1). Estas sintetetas de CoA son aplicables para la atenuación, ya sea como una succinil-CoA sintetasa o como una enzima convertidora de succinil-CoA de la invención.

25

Las enzimas CoA sintetasa con amplia especificidad de sustrato también pueden ser activas en succinil-CoA. Por ejemplo, se ha demostrado que la ACD I de *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1211, opera en una variedad de sustratos de cadena lineal y ramificada que incluyen isobutirato, isopentanoato y fumarato (Musfeldt et al., *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). También se demostró que una segunda ACD reversible en *Archaeoglobus fulgidus*, codificada por AF1983, tenía un amplio rango de sustratos (Musfeldt y Schonheit, *J. Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). El ACD codificado por PAE3250 de *Pyrobaculum aerophilum* de crenarchaeon hipertermófilo mostró el rango de sustratos más amplio de todas las ACD caracterizadas, reaccionando con acetil-CoA, isobutiril-CoA (sustrato preferido) y fenilacetil-CoA (Brasen et al., *Arch Microbiol* 182: 277-287 (2004)). La evolución dirigida o la ingeniería pueden usarse para modificar esta enzima para que funcione a la temperatura fisiológica del organismo huésped. La enzima de *Haloarcula marismortui* (anotada como una succinil-CoA sintetasa) acepta, por ejemplo, propionato, butirato y ácidos de cadena ramificada (isovalerato e isobutirato) como sustratos, y se demostró que funciona en las direcciones directa e inversa (Brasen et al. al., *Arch Microbiol* 182: 277-287 (2004)). Las enzimas de *A. fulgidus*, *H. marismortui* y *P. aerophilum* han sido clonadas, expresadas funcionalmente y caracterizadas en *E. coli* (Brasen y Schonheit, supra; Musfeldt y Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002)). Se ha demostrado que la acil CoA ligasa de *Pseudomonas putida* funciona en varios sustratos alifáticos, incluidos los ácidos acético, propiónico, butírico,

35

40

5 valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico, y en compuestos aromáticos como los ácidos fenilacético y fenoxiacético (Fernández-Valverde et al., Appl. Environ. Microbiol 59:1149-1154 (1993)). Una enzima relacionada, la malonil CoA sintetasa (6.3.4.9) de *Rhizobium leguminosarum* podría convertir varios diácidos, a saber, etil-, propil-, alil-, isopropil-, dimetil-, ciclopropil-, ciclopropilmetil-, ciclobutil- y bencil-malonato en sus correspondientes monotoioésteres (Pohl et al., J. Am. Chem. Soc. 123:5822-5823 (2001)). Ejemplos de CoA sintetetas se resumen a continuación en la Tabla 11. Las sintetetas de CoA que tienen actividad succinil-CoA sintetasa son aplicables como una succinil-CoA sintetasa o una enzima convertidora de succinil-CoA de la invención y, por lo tanto, pueden ser objeto de atenuación.

Tabla 11. Sintetetas de CoA ejemplares

Proteína	GenBank ID	Número GI	Organismo
scs	YP_135572.1	55377722	Haloarcula marismortui
AF1211	NP_070039.1	11498810	Archaeoglobus fulgidus
AF1983	NP_070807.1	11499565	Archaeoglobus fulgidus
PAE3250	NP_560604.1	18313937	Pyrobaculum aerophilum str. IM2
paaF	AAC24333.2	22711873	Pseudomonas putida
matB	AAC83455.1	3982573	Rhizobium leguminosarum

10 Las rutas metabólicas de varios pasos, que no sean el ciclo TCA, también pueden ser objetivo de la atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA para reducir el flujo de carbono de succinil-CoA a succinato. Por ejemplo, mientras que las CoA hidrolasas, transferasas y sintetetas convierten la succinil-CoA en succinato en un solo paso enzimático, los expertos en la materia comprenderán que otras rutas metabólicas multienzimáticas también podrían catalizar esta reacción neta. Las rutas ejemplares de múltiples pasos que se pueden usar para la atenuación de una enzima productora de succinato dentro de una ruta de múltiples pasos que tiene una conversión neta de succinil-CoA en succinato incluyen: las rutas de (1) degradación de arginina, (2) biosíntesis de lisina y (3) biosíntesis de metionina. La estequiometría neta de la reacción de succinil-CoA a succinato se muestra en la Tabla 12 a continuación.

20 Tabla 12. Estequiometría neta de succinil-CoA en succinato en rutas de múltiples pasos

Genes en E. coli	Ruta	Reacción neta	Número de reacciones
astABCDE	Degradación de arginina	$\text{Arg} + \text{Suc-CoA} + \text{AKG} + 4 \text{H}_2\text{O} + \text{NAD} \rightarrow \text{Succ} + 2 \text{Glutamato} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{CoA}$	5
dapD-argD-dapE	Biosíntesis de lisina	$\text{THD} + \text{Suc-CoA} + \text{Glutamato} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DAP} + \text{succinato} + \text{AKG} + \text{CoA}$	3
metAB	Biosíntesis de metionina	$\text{Homoserina} + \text{Suc-CoA} + \text{Cisteína} \rightarrow \text{Cistationa} + \text{Succ} + \text{Homocys} + \text{Pyr} + \text{CoA}$	2

25 Al igual que con todas las demás atenuaciones descritas en este documento, la atenuación de una enzima productora de succinato dentro de una ruta de múltiples pasos puede ser una modificación génica u otra modificación genética descrita en este documento o habitual en la técnica que dé como resultado una disminución de la expresión génica o la actividad del producto génico. Tales métodos incluyen, por ejemplo, modificar un promotor, una región reguladora o un regulador de la expresión génica del gen codificador.

30 Las enzimas productoras de succinato dentro de las rutas de pasos múltiples ejemplares anteriores incluyen las enzimas que catalizan el paso de conversión de succinil-CoA a succinato dentro de cada ruta, así como cualquiera de las enzimas que catalizan una reacción anterior al paso de conversión de succinil-CoA a succinato dentro de la ruta que prohibiría la formación posterior de succinato. Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que las enzimas dentro de numerosas otras rutas de múltiples pasos que tienen una conversión neta de succinil-CoA a succinato también pueden ser objeto de atenuaciones para reducir el flujo de carbono de succinil-CoA a succinato. Dichas enzimas incluyen, por ejemplo, aquellas enzimas de la ruta que convierten succinil-CoA en succinato, así como aquellas enzimas anteriores a la etapa de conversión de succinil-CoA en succinato que, si se atenúan, dan como resultado la pérdida o eliminación de succinato posterior en la ruta de múltiples pasos.

Un organismo microbiano no natural de la invención incluye, al menos, una segunda atenuación de un gen que codifica la enzima convertidora de succinil-CoA o un gen que codifica una enzima productora de succinato dentro de una ruta de múltiples pasos que tiene una conversión neta de succinil-CoA a succinato. Por consiguiente, en esta realización, el organismo microbiano no natural puede incluir más de una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o de una enzima productora de succinato. La inclusión de dos o más segundas atenuaciones puede reducir aún más el flujo de carbono a través de un ciclo oxidativo de TCA, lo que reduce adicionalmente la formación de subproductos de CO<sub>2</sub>. Por lo tanto, un organismo microbiano de la invención puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más atenuaciones secundarias de un gen que codifica una enzima convertidora de succinil-CoA o que codifica una enzima productora de succinato dentro de una ruta de múltiples pasos que tiene una conversión neta de succinil-CoA a succinato. Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán cuántas y cuáles de las segundas atenuaciones son útiles para alguna aplicación particular.

Por lo tanto, la invención proporciona además un organismo microbiano de origen no natural que tiene una primera y, al menos, una segunda atenuación. La primera atenuación puede ser una succinil-CoA sintetasa y la succinil-CoA sintetasa puede estar codificada, por ejemplo, por sucCD. La primera atenuación también puede ser una succinil-CoA transferasa. La primera atenuación también puede ser una succinil-CoA sintetasa codificada por un gen expuesto en las Tablas 1 u 11. La primera atenuación también puede ser una succinil-CoA sintetasa o succinil-CoA transferasa codificada por un gen expuesto en las Tablas 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11. La, al menos, segunda atenuación puede ser una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato dentro de una ruta de múltiples etapas que tiene una conversión neta de succinil-CoA a succinato. La, al menos, segunda atenuación puede ser una CoA hidrolasa, CoA transferasa o CoA sintetasa codificada por un gen expuesto en las Tablas 1-11 o la, al menos, segunda atenuación puede ser una o más enzimas productoras de succinato establecidas en la Tabla 12. La, al menos, segunda atenuación puede ser YciA CoA hidrolasa codificada por el gen yciA. La, al menos, segunda atenuación puede ser dos o más, incluidas de unas pocas a muchas enzimas convertidoras de succinil-CoA o una enzima productora de succinato.

La invención también proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de un gen que codifica una succinil-CoA sintetasa y al menos una segunda atenuación del gen que codifica la enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato dentro de una ruta de múltiples pasos, en donde el nivel de producción de succinato a través de una ruta oxidativa del ácido tricarbóxico (TCA) se reduce en un 25% o más en comparación con un organismo microbiano ausente de la segunda atenuación. Los expertos en la materia entienden que un organismo microbiano ausente de la segunda atenuación se refiere a un organismo microbiano que carece de la modificación genética de la segunda atenuación, y la actividad se puede comparar con un organismo que carece de la modificación genética de la segunda atenuación.

Como se describió anteriormente, la atenuación de una succinil-CoA sintetasa y al menos un segundo gen que codifica, por ejemplo, una enzima convertidora de succinil-CoA, da como resultado una disminución significativa y no aditiva en la producción de succinato a través de una ruta oxidativa de TCA en comparación con un organismo que tiene atenuación de una succinil-CoA sintetasa sola. La reducción en la producción de succinato a través de TCA oxidativo puede ser, por ejemplo, del 20% o más, incluida una reducción del 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o más. Por consiguiente, un organismo microbiano de la invención puede tener un nivel de actividad de succinil-CoA a succinato reducida en un 25% o más en comparación con un organismo microbiano ausente de una segunda atenuación. La actividad de succinil-CoA a succinato puede reducirse, por ejemplo, 20% o más, incluida una reducción de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o más. Además, un organismo microbiano de la invención puede tener un nivel de flujo de <sup>13</sup>C de succinil-CoA a succinato reducido en un 25% o más en comparación con un organismo microbiano ausente de dicha segunda atenuación. El flujo <sup>13</sup>C de succinil-CoA a succinato puede reducirse, por ejemplo, un 20% o más, incluida una reducción de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o más.

La interrupción de una succinil-CoA sintetasa y al menos un segundo gen que codifica, por ejemplo, una enzima convertidora de succinil-CoA también da como resultado una reducción del exceso de CO<sub>2</sub> producido a través de TCA oxidativo en comparación con un organismo que tiene atenuación de una succinil-CoA sintetasa sola. La reducción en el exceso de producción de CO<sub>2</sub> a través de TCA oxidativo puede ser, por ejemplo, 10% o más en comparación con un organismo microbiano ausente de una segunda atenuación. Como se describió anteriormente, una disminución en el exceso de CO<sub>2</sub> facilita un mayor flujo de carbono hacia la producción de compuestos bioderivados y, por lo tanto, mayores rendimientos de tales compuestos bioderivados. En consecuencia, una reducción en el exceso de producto de CO<sub>2</sub> a través de TCA oxidativo puede ser, por ejemplo, 15% o más, incluida una reducción de 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o más.

De manera similar, la interrupción tanto de una succinil-CoA sintetasa como de al menos un segundo gen que codifica, por ejemplo, una enzima convertidora de succinil-CoA, además da como resultado una menor utilización de oxígeno por célula en comparación con un organismo que tiene una atenuación de una succinil-CoA sintetasa sola. La reducción en la utilización de oxígeno por célula puede ser, por ejemplo, 10% o más en comparación con un organismo microbiano ausente de una segunda atenuación. La disminución de la utilización de oxígeno del organismo microbiano es útil para la producción de compuestos bioderivados en condiciones de cultivo micro anaeróbico y anaerobio. En consecuencia, una reducción en la utilización de oxígeno (O<sub>2</sub>) por célula puede ser, por



ejemplo, del 15% o más, incluida una reducción del 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% , 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o más.

Por consiguiente, la invención también proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y al menos una segunda atenuación de la enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato dentro de una ruta de múltiples pasos en donde un nivel del exceso de CO<sub>2</sub> a través del TCA oxidativo se reduce en un 10% o más en comparación con un organismo microbiano ausente de la segunda atenuación (es decir, en comparación con un organismo microbiano parental que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa). Además, el nivel de utilización de oxígeno (O<sub>2</sub>) por célula se reduce en un 10% o más en comparación con un organismo microbiano ausente de la segunda atenuación (es decir, en comparación con un organismo microbiano parental que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa).

La invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano no natural que tiene una mayor expresión de una piridina-nucleótido transhidrogenasa de (NAD(P)transhidrogenasa). El aumento de la expresión puede ser solo o en combinación con cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, el aumento de la expresión de una NAD(P)transhidrogenasa en un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato como se describe en este documento. Por lo tanto, la invención también proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato e incluye además una mayor expresión de una NAD(P)transhidrogenasa. La mayor expresión puede ser la expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica la NAD(P)transhidrogenasa. El aumento de la expresión también puede incluir, por ejemplo, la regulación al alza de la expresión del gen que codifica la transhidrogenasa o la eliminación de la regulación negativa de un gen que codifica la transhidrogenasa. Los ejemplos de la regulación al alza incluyen, por ejemplo, modificar el promotor para hacerlo más fuerte, aumentar la fuerza del sitio o sitios de unión al ribosoma, sustituir un promotor más fuerte y / u opcionalmente aumentar el número de copias del gen. Los ejemplos de eliminación de la regulación negativa incluyen la modificación de los elementos cis reguladores del gen o los elementos reguladores trans. La piridin-nucleótido transhidrogenasa puede ser una transhidrogenasa translocante de protones.

A este respecto, los organismos microbianos no naturales de la invención pueden incluir además una o más modificaciones genéticas que aumenten la expresión de una NAD(P)transhidrogenasa en el organismo microbiano. Una NAD(P)transhidrogenasa cataliza la transferencia de equivalentes reductores entre NAD(H) y NADP(H), junto con la translocación de protones a través de una membrana (Jackson, FEBS Letters 545: 18 (2003)). En esta realización, la producción de CO<sub>2</sub> en exceso se reduce aún más reduciendo el flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA, así como a través de la ruta de la pentosa fosfato.

Una NAD(P)transhidrogenasa útil para reducir la producción de CO<sub>2</sub> en exceso aumentando su expresión en un organismo microbiano huésped de la invención puede ser la NAD(P)transhidrogenasa PntAB o sus homólogos. La expresión de PntAB u otras transhidrogenasas de NAD(P) puede ocurrir, por ejemplo, por la sobreexpresión de un gen codificador endógeno y / o la expresión de un ácido nucleico codificador exógeno. Como se describe más adelante, hay otros métodos disponibles para aumentar la expresión de un ácido nucleico endógeno o exógeno que incluye, por ejemplo, incorporar promotores más fuertes y / o elementos reguladores positivos de los ácidos nucleicos codificadores endógenos, ácidos nucleicos codificadores exógenos o ambos. Los expertos en la materia apreciarán que algunos o todos estos métodos pueden usarse, solos o en combinación, para aumentar la expresión de un ácido nucleico codificante. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para pntA y pntB de *Escherichia coli* se pueden encontrar descritas en Clarke et al., 158: 647-653 (1986).

Además, se proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una atenuación de una enzima del ciclo TCA. La atenuación de una enzima del ciclo TCA puede ser sola o estar en combinación con cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento, incluida, por ejemplo, la atenuación de un ácido nucleico endógeno que codifica una enzima del ciclo TCA en un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato como se describe en este documento. En este último ejemplo, la atenuación de una enzima del ciclo TCA es diferente de las atenuaciones primera y segunda. La atenuación puede ser de una succinil-CoA sintetasa dentro del ciclo TCA. Por ejemplo, la atenuación puede ser, por ejemplo, deshidrogenasa succínica, fumarasa y malato deshidrogenasa. La atenuación puede ser una modificación génica u otra alteración genética descrita en este documento o habitual en la técnica que dé como resultado una disminución de la expresión génica o la actividad del producto génico. Tales métodos incluyen, por ejemplo, modificar un promotor, una región reguladora o un regulador de la expresión génica del gen codificador.

Las modificaciones genéticas descritas en el presente documento son aplicables a la producción microbiana de compuestos bioderivados que se inician a partir de cualquier intermediario metabólico, incluidos, por ejemplo, sustratos o intermedios dentro del ciclo TCA, así como sustratos o intermedios dentro de otras rutas metabólicas. Por lo tanto, las modificaciones genéticas descritas en el presente documento son aplicables a la reducción de la producción de succinato a partir de succinil-CoA, la reducción del exceso de CO<sub>2</sub> y la reducción de la utilización de

O<sub>2</sub>, así como para aumentar la disponibilidad de ATP como se describe más adelante. Descrito en referencia a la producción de un compuesto bioderivado a partir de un intermedio del ciclo TCA o un sustrato del ciclo TCA, por ejemplo, la atenuación de una succinil-CoA sintetasa todavía permite el uso de intermedios y sustratos de TCA anterior a succinil-CoA para ser utilizados en la producción de un compuesto bioderivado. La atenuación de una succinil-CoA sintetasa, sola o en combinación con una segunda enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato como se describe en el presente documento reduce el flujo de carbono en intermedios posteriores del ciclo TCA y aumenta el flujo de carbono disponible para la biosíntesis de compuestos bioderivados. Ejemplos de intermedios del ciclo TCA útiles para la síntesis de compuestos bioderivados incluyen  $\alpha$ -cetoglutarato (AKG) y succinil-CoA. Un sustrato de ciclo de TCA ejemplar incluye acetil-CoA.

Como se usa en este documento, un "ciclo intermedio de TCA" se refiere a uno de los nueve sustratos o productos del ciclo de TCA utilizados para generar energía a través de la oxidación de acetato. Estos nueve sustratos son citrato, cis-aconitato, d-isocitrato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato, malato y oxaloacetato. Un "sustrato del ciclo TCA", según se usa en el presente documento, se refiere a un sustrato usado en el ciclo TCA distinto de los nueve compuestos anteriores. Por ejemplo, acetil-CoA es un sustrato del ciclo TCA porque se combina con oxaloacetato para formar citrato.

Los compuestos bioderivados de la invención incluyen, pero no se limitan a, alcoholes, glicoles, ácidos orgánicos, alquenos, dienos, aminas orgánicas, aldehídos orgánicos, vitaminas, productos nutracéuticos y farmacéuticos. Los compuestos bioderivados específicos dentro de estas categorías de compuestos bioderivados que son aplicables para ser sintetizados usando un organismo microbiano de la invención diseñado metabólicamente para biosintetizar compuestos bioderivados incluyen, por ejemplo, 4-hidroxibutirato (4HB), 1,4-butanodiol (1,4-BDO), 1,3-butanodiol (1,3-BDO), polihidroxilbutanoato (PHB), butadieno, adipato, 6-aminocaproato, caprolactama, ácido metacrílico, isopropanol, alcoholes de cadena larga, hexametilendiameno, metacrilato de metilo, butanol, 3-buten-1-ol, 3-buten-2-ol y alcohol crotilico. Por lo tanto, la invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano de origen no natural que tiene una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un sustrato del ciclo TCA. El compuesto bioderivado puede ser 4HB, 1,4-BDO, 1,3-BDO, PHB, butadieno, adipato, 6-aminocaproato, caprolactama, ácido metacrílico, isopropanol, alcoholes de cadena larga, hexametilendiameno, metacrilato de metilo, butanol, 3-buten-1-ol, 3-buten-2-ol y alcohol crotilico. El organismo microbiano puede comprender la ruta de ingeniería metabólica opcionalmente en combinación con cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un sustrato del ciclo TCA en un organismo microbiano de origen no natural que tiene un primer atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato como se describió anteriormente.

A continuación se ejemplifican otros compuestos bioderivados dentro de las categorías anteriores que también son aplicables para ser sintetizados usando el organismo microbiano de la invención. Por ejemplo, los alcoholes de la invención, que incluyen alcoholes de biocombustibles, incluyen alcoholes primarios, alcoholes secundarios, dioles y trioles, que tienen preferiblemente átomos de carbono C3 a C10. Los alcoholes incluyen n-propanol e isopropanol. Los alcoholes de biocombustibles son preferiblemente C3-C10 e incluyen 1-propanol, isopropanol, 1-butanol, isobutanol, 1-pentanol, isopentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 1-heptanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-hexanol. Los dioles incluyen propanodiol y butanodiol, que incluyen 1,4-butanodiol, 1,3-butanodiol y 2,3-butanodiol. Los alcoholes grasos incluyen alcoholes grasos C4-C27, que incluyen C12-C18, especialmente C12-C14, que incluyen alcoholes grasos lineales saturados o insaturados.

Otros compuestos bioderivados ejemplares de la invención incluyen: (a) 1,4-butanodiol e intermedios a los mismos, tales como ácido 4-hidroxibutanoico (4-hidroxibutanoato, 4-hidroxibutirato (4-HB)); (b) butadieno (1,3-butadieno) e intermedios a los mismos, tales como 1,4-butanodiol, 1,3-butanodiol, 2,3-butanodiol, alcohol crotilico, 3-buten-2-ol (metil vinil carbinol) y 3-buten-1-ol; (c) 1,3-butanodiol e intermedios a los mismos, tales como 3-hidroxibutirato (3-HB), 2,4-pentadienoato, alcohol crotilico o 3-buten-1-ol; (d) adipato, ácido 6-aminocaproico (6-ACA), caprolactama, hexametilendiamina (HMDA) y ácido levulínico y sus intermedios, por ejemplo, adipil-CoA, 4-aminobutiril-CoA; (e) ácido metacrílico (ácido 2-metil-2-propenoico) y sus ésteres, tales como metacrilato de metilo y otros ésteres de metacrilato (conocidos colectivamente como metacrilatos), 3-hidroxiisobutirato y / o 2-hidroxiisobutirato y sus intermedios; (f) glicoles, incluido 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, glicerol, etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, dipropilenglicol, tripropilenglicol, neopentilglicol y bisfenol A y sus intermedios; (g) ácido succínico y sus intermedios; y (h) alcoholes grasos, que son compuestos alifáticos que contienen uno o más grupos hidroxilo y una cadena de 4 o más átomos de carbono, o ácidos grasos y aldehídos grasos de los mismos, que son preferiblemente átomos de carbono C4-C27. Los alcoholes grasos incluyen alcoholes grasos saturados, alcoholes grasos insaturados y alcoholes grasos saturados lineales. Ejemplos de alcoholes grasos incluyen alcoholes de butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo y dodecilo y sus derivados oxidados correspondientes, es decir, aldehídos grasos o ácidos grasos que tienen el mismo número de átomos de carbono. Los alcoholes grasos, los aldehídos grasos y los ácidos grasos preferidos tienen átomos de carbono C8 a C18, especialmente C12-C18, C12-C14 y C16-C18, incluidos los átomos de carbono C12, C13, C14, C15, C16, C17 y C18. Los alcoholes grasos preferidos incluyen alcoholes grasos insaturados lineales, tales como dodecanol (C12; alcohol laurílico), alcohol tridecílico (C13; 1-tridecanol, tridecanol, isotridecanol), alcohol miristílico (C14; 1-tetradecanol), alcohol pentadecilo (C15; 1-pentadecanol, pentadecanol), alcohol cetílico (C16; 1-hexadecanol), alcohol heptadecilo (C17; 1-n-heptadecanol, heptadecanol) y alcohol estearílico (C18; 1-octadecanol) y sus homólogos insaturados, incluido el

alcohol palmítico (C16 insaturado; cis-9-hexadecen-1-ol), o sus correspondientes aldehídos grasos o ácidos grasos.

El 1,4-butanodiol y sus intermedios, como el ácido 4-hidroxi-butanoico (4-hidroxi-butanoato, 4-hidroxi-butirato, 4-HB), son compuestos bioderivados que pueden prepararse a través de las rutas enzimáticas descritas en este documento y en las siguientes publicaciones. En el documento WO2008115840A2, publicado el 25 de septiembre de 2008, titulado "Compositions and Methods for the Biosynthesis of 1,4-Butanediol and Its Precursors", y en los documentos US20090075351; WO2010141780A1 publicado el 9 de diciembre de 2010 titulado "Process of Separating Components of A Fermentation Broth" y los documentos US20110003355; WO2010141920A2, publicado el 9 de diciembre de 2010 y titulado "Microorganisms for the Production of 1,4-Butanediol and Related Methods" y los documentos US20110045575; WO2010030711A2 publicado el 18 de marzo de 2010 titulado "Microorganisms for the Production of 1,4-Butanediol" y los documentos US20100112654; WO2010071697A1 publicado el 24 de Junio de 2010 y titulado "Microorganisms and Methods for Conversion of Syngas and Other Carbon Sources to Useful Products" y los documentos US20100304453; WO2009094485A1 publicado el 30 de Julio de 2009 y titulado "Methods and Organisms for Utilizing Synthesis Gas or Other Gaseous Carbon Sources and Methanol" y los documentos US20090191593; y WO2009023493A1 publicado el 19 Febrero de 2009 y titulado "Methods and Organisms for the Growth-Coupled Production of 1,4-Butanediol" y el documento US20090047719. Ejemplos de rutas BDO se describen en las referencias anteriores y pueden incluir, por ejemplo, una  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y una semialdehído deshidrogenasa succínica dependiente de CoA, o una  $\alpha$ -cetoglutarato descarboxilasa, o un glutamato: succinato semialdehído transaminasa y una glutamato descarboxilasa; una 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa; una 4-hidroxi-butiril-CoA: acetil-CoA transferasa, o una butirato quinasa y una fosfotransbutirilasa, una aldehído deshidrogenasa y una alcohol deshidrogenasa, o una aldehído / alcohol deshidrogenasa, (véase el documento US 20090075351).

El butadieno y sus productos intermedios, como 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1,3-butanodiol, alcohol crotilico, 3-buten-2-ol (metilvinil carbinol) y 3-buten-1-ol, son compuestos bioderivados que pueden prepararse mediante las rutas enzimáticas descritas en este documento y en las siguientes publicaciones. Además de la fermentación directa para producir butadieno, se puede separar, purificar 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, alcohol crotilico, 3-buten-2-ol (metilvinilcarbinol) o 3-buten-1-ol (para cualquier uso), y luego deshidratarlo químicamente a butadieno por catálisis a base de metales. En el documento WO2011140171A2, publicado el 10 de noviembre de 2011, titulado "Microorganisms and Methods for the Biosynthesis of Butadiene" y los documentos US20110300597; WO2012018624A2 publicado el 9 de febrero de 2012 titulado "Microorganisms and Methods for the Biosynthesis of Aromatics, 2,4-Pentadienoate and 1,3-Butadiene" y los documentos US20120021478; WO2013040383A1 publicado el 21 de marzo de 2013 titulado "Microorganisms and Methods for Producing Alkenes" y los documentos US20130122563; WO2012177710A1 publicado el 27 de diciembre de 2012 titulado "Microorganisms for Producing Butadiene and Methods Related thereto" y los documentos US20130011891; WO2012106516A1 publicado el 9 de agosto de 2012 titulado "Microorganisms and Methods for the Biosynthesis of Butadiene" y los documentos US20120225466; y WO2013028519A1 publicado el 28 de febrero de 2013 titulado "Microorganisms and Methods for Producing 2,4-Pentadienoate, Butadiene, Propylene, 1,3-Butanediol and Related Alcohols" y el documento US20130109064.

El 1,3-butanodiol y sus productos intermedios, como el 2,4-pentadienoato, el alcohol crotilico o el 3-buten-1-ol, son compuestos bioderivados que pueden prepararse mediante las rutas enzimáticas descritas en este documento y en las siguientes publicaciones. En el documento WO2011071682A1 publicado el 16 de junio de 2011 titulado "Methods and Organisms for Converting Synthesis Gas or Other Gaseous Carbon Sources and Methanol to 1,3-Butanediol" y los documentos US20110129904; WO2011031897A publicado el 17 de marzo de 2011 titulado "Microorganisms and Methods for the Co-Production of Isopropanol with Primary Alcohols, Diols and Acids" y los documentos US 20110201068; WO2010127319A2 publicado el 4 de noviembre de 2010 titulado "Organisms for the Production of 1,3-Butanediol" y los documentos US20100330635; WO2013071226A1 publicado el 16 de mayo de 2013 titulado "Eukaryotic Organisms and Methods for Increasing the Availability of Cytosolic Acetyl-CoA, and for Producing 1,3-Butanediol" y los documentos US20130066035; WO2013028519A1 publicado el 28 de febrero de 2013 titulado "Microorganisms and Methods for Producing 2,4-Pentadienoate, Butadiene, Propylene, 1,3-Butanediol and Related Alcohols" y los documentos US 20130109064; WO2013036764A1 publicado el 14 de marzo de 2013 titulado "Eukaryotic Organisms and Methods for Producing 1,3-Butanediol" y los documentos US20130066035; WO2013012975A1 publicado el 24 de enero de 2013 titulado "Methods for Increasing Product Yields" y el documento WO2012177619A2 publicado el 27 de diciembre de 2012 titulado "Microorganisms for Producing 1,3-Butanediol and Methods Related Thereto" y el documento US20120329113.

Adipato, ácido 6-aminocaproico, caprolactama, hexametilendiamina y ácido levulínico, y sus intermedios, p. ej. 4-aminobutiril-CoA, son compuestos bioderivados que pueden prepararse mediante las rutas enzimáticas descritas en este documento y en las siguientes publicaciones. En el documento WO2010129936A1 publicado el 11 de noviembre de 2010 titulado "Microorganisms and Methods for the Biosynthesis of Adipate, Hexamethylenediamine and 6-Aminocaproic Acid" y los documentos US20120282661; WO2013012975A1 publicado el 24 de enero de 2013 titulado "Methods for Increasing Product Yields"; el documento WO2012177721A1 publicado el 27 de diciembre de 2012 titulado "Microorganisms for Producing 6-Aminocaproic Acid"; el documento WO2012099621A1 publicado el 26 de julio de 2012 titulado "Methods for Increasing Product Yields" y US20110201089; y WO2009151728 publicado el

17 de diciembre de 2009 titulado "Microorganisms for the Production of Adipic Acid and other Compounds" y el documento US20090305364.

El ácido (ácido 2-metil-2-propenoico) metacrílico se usa en la preparación de sus ésteres, conocidos colectivamente como metacrilatos (por ejemplo, metacrilato de metilo, que se usa principalmente en la fabricación de polímeros). El ácido metacrílico, los ésteres de metacrilato, como el metacrilato de metilo, y los precursores, como el 3-hidroxiisobutirato y / o el 2-hidroxiisobutirato, y sus intermedios, son compuestos bioderivados que pueden prepararse mediante las rutas enzimáticas descritas en este documento y en las siguientes publicaciones. En el documento WO2012135789A2, publicado el 4 de octubre de 2012, titulado "Microorganisms for Producing Methacrylic Acid and Methacrylate Esters and Methods Related Thereto" y en los documentos US20130065279, y WO2009135074A2 publicado el 5 de noviembre de 2009 titulado "Microorganisms for the Production of Methacrylic Acid" y el documento US20090275096.

1,2-Propanodiol (propilenglicol), n-propanol, 1,3-propanodiol y glicerol, y sus intermedios son compuestos bioderivados que pueden prepararse a través de las rutas enzimáticas descritas en este documento y en las siguientes publicaciones. En el documento WO2009111672A1, publicado el 9 de noviembre de 2009, titulado "Primary Alcohol Producing Organisms" y el documento US20090275097, se encuentran rutas y enzimas de compuestos bioderivados adecuados, métodos de detección y métodos de aislamiento. El documento WO2011031897A1 publicado el 17 de marzo de 2011 y titulado "Microorganisms and Methods for the Co-Production of Isopropanol with Primary Alcohols, Diols and Acids" y los documentos US20110201068; WO2012177599A2 publicado el 27 de diciembre de 2012 titulado "Microorganisms for Producing N-Propanol 1,3-Propanediol, 1,2-Propanediol or Glycerol and Methods Related Thereto".

El ácido succínico y sus intermedios, que son útiles para producir productos que incluyen polímeros (por ejemplo, succinato de polibutileno o PBS), 1,4-butanodiol, tetrahidrofurano, pirrolidona, disolventes, pinturas, descongeladores, plásticos, aditivos para combustibles, telas, alfombras, pigmentos y detergentes son compuestos bioderivados que pueden prepararse mediante las rutas enzimáticas descritas en este documento y en la siguiente publicación. En el documento EP1937821A2 publicado el 2 de julio de 2008 titulado "Methods and Organisms for the Growth-Coupled Production of Succinate", el documento WO / 2007/030830 publicado el 15 de marzo de 2007 y titulado "Methods and Organisms for the Growth-coupled Production of Succinate" y el documento US20070111294. Los expertos en la materia entienden que la producción de succinato como producto deseado puede ser aplicable en los organismos microbianos de la invención, si se desea, en particular aquellos organismos microbianos que tienen modificaciones metabólicas que no dan como resultado una producción disminuida de succinato, por ejemplo, una modificación metabólica que afecte a la conversión de succinil-CoA en succinato.

Los alcoholes primarios y los alcoholes grasos (también conocidos como alcoholes de cadena larga), incluidos los ácidos grasos y los aldehídos grasos de los mismos, y los intermedios de los mismos, son compuestos bioderivados que pueden prepararse a través de rutas enzimáticas en las siguientes publicaciones. En el documento WO2009111672, publicado el 11 de septiembre de 2009, titulado Primary Alcohol Producing Organisms y el documento US20090275097; el documento WO2012177726 publicado el 27 de diciembre de 2012 y titulado "Microorganism for Producing Primary Alcohols and Related Compounds and Methods Related Thereto" se encuentran rutas y enzimas de compuestos bioderivados adecuados, métodos de detección y métodos de aislamiento.

Se incluyen en la invención otros compuestos bioderivados adecuados a los organismos microbianos de la invención que pueden usarse para producir mediante acetil-CoA, incluyendo opcionalmente además mediante acetoacetil-CoA y / o succinil-CoA. Ejemplos de compuestos bioderivados habituales, sus rutas y enzimas para la producción, métodos de detección y métodos de aislamiento se encuentran en las siguientes patentes y publicaciones: succinato (publicación estadounidense 2007/0111294, WO 2007/030830, WO 2013/003432), ácido 3-hidroxiopropiónico (3-hidroxiopropionato) (publicación estadounidense 2008/019926, WO 2008/091627, patente estadounidense 2010/0021978), 1,4-butanodiol (patente estadounidense 8067214, WO 2008/115840, patente estadounidense 7947483, WO 2009/023493, patente estadounidense 7858350, WO 2010/030711, patente estadounidense 2011/0003355, WO 2010/141780, patente estadounidense 8129169, WO 2010/141920, patente estadounidense 2011/0201068, WO 2011/031897, patente estadounidense 8377666, WO 2011/047101, patente estadounidense 2011/0217742, WO 2011/066076, patente estadounidense 2013/0034884, WO 2012/177943), ácido 4-hidroxiбутаноico (4-hidroxiбутаноato, 4-hidroxiбутирато, 4-hidroxiбутиратио) (patente estadounidense 8067214, WO 2008/115840, patente estadounidense 7947483, WO 2009/023493, patente estadounidense 7858350, WO 2010/030711, patente estadounidense 2011/0003355, WO 2010/141780, patente estadounidense 8129155, WO 2010/071697),  $\gamma$ -butirolactona (patente estadounidense 8067214, WO 2008/115840, patente estadounidense 7947483, WO 2009/023493, patente estadounidense 7858350, WO 2010/030711, patente estadounidense 2011/0003355, WO 2010/141780, patente estadounidense 2011/0217742, WO 2011/066076), 4-hidroxiбутирил-CoA (patente estadounidense 2011/0003355, WO 2010/141780, patente estadounidense 2013/0034884, WO 2012/177943), 4-hidroxiбутанал (patente estadounidense 2011/0003355, WO 2010/141780, patente estadounidense 2013/0034884, WO 2012/177943), putrescina (patente estadounidense 2011/0003355, WO 2010/141780, patente estadounidense 2013 / 0034884, WO 2012/177943), olefinas (tales como ácido acrílico y éster de acrilato) (patente estadounidense 8026386, WO 2009/045637), acetil-CoA (patente estadounidense 8323950, WO 2009/094485), tetrahidrofolato de metilo (patente estadounidense 8323950, WO 2009/094485), etanol (patente estadounidense

8129155, WO 2010/071697), isopropanol (patente estadounidense 8129155, WO 2010/071697, patente estadounidense 2010/0323418, WO 2010/127303, patente estadounidense 2011/0201068, WO 2011/031897), n-butanol (patente estadounidense 8129155, WO 2010/071697), isobutanol (patente estadounidense 8129155, WO 2010/071697), n-propanol (patente estadounidense 2011/0201068, WO 2011/031897), ácido metilacrílico (metilacrilato) (patente estadounidense 2011/0201068, WO 2011/031897), alcohol primario (patente estadounidense 7977084, WO 2009/111672, WO 2012/177726), alcohol de cadena larga (patente estadounidense 7977084, WO 2009/111672, WO 2012/177726), adipato (ácido adípico) (patente estadounidense 8062871, WO 2009/151728, patente estadounidense 8377680, WO 2010/129936, WO 2012/177721), 6-aminocaproato (ácido 6-aminocaproico) (patente estadounidense 8062871, WO 2009/151728, patente estadounidense 8377680, WO 2010/129936, WO 2012/177721), caprolactama (patente estadounidense 8062871, WO 2009/151728, patente estadounidense 8377680, WO 2010/129936, WO 2012/177721), hexametilendiamina (patente estadounidense 8377680, WO 2010/129936, WO 2012/177721), ácido levulínico (patente estadounidense 8377680, WO 2010/129936), ácido 2-hidroxiisobutírico (2-hidroxiisobutirato) (patente estadounidense 8241877, WO 2009/135074, patente estadounidense 2013/0065279, WO 2012/135789), ácido 3-hidroxiisobutírico (3-hidroxiisobutirato) (patente estadounidense 8241877, WO 2009 / 135074, patente estadounidense 2013/0065279, WO 2012/135789), ácido metacrílico (metacrilato) (patente estadounidense 8241877, WO 2009/135074, patente estadounidense 2013/0065279, WO 2012/135789), éster de metacrilato (patente estadounidense 2013/0065279, WO 2012/135789), fumarato (ácido fumárico) (patente estadounidense 8129154, WO 2009/155382), malato (ácido málico) (patente estadounidense 8129154, WO 2009/155382), acrilato (ácido carboxílico) (patente estadounidense 8129154, WO 2009/155382), metil etil cetona (patente estadounidense 2010/0184173, WO 2010/057022, patente estadounidense 8420375, WO 2010/144746), 2-butanol (patente estadounidense 2010/0184173, WO 2010/057022, patente estadounidense 8420375, WO 2010/144746), 1,3-butanodiol (patente estadounidense 2010/0330635, WO 2010/127319, patente estadounidense 2011/0201068, WO 2011/031897, patente estadounidense 8268607, WO 2011/071682, patente estadounidense 2013/0109064, WO 2013/028519, patente estadounidense 2013/0066035, WO 2013/036764), ciclohexanona (patente estadounidense 2011/0014668, WO 2010/132845), tereftalato (ácido tereftálico) (patente estadounidense 2011/0124911, WO 2011/017560, patente estadounidense 2011/0207185, WO 2011/094131, patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624), muconato (ácido mucónico) (patente estadounidense 2011/0124911, WO 2011/017560), anilina (patente estadounidense 2011/0097767, WO 2011/050326), p-tolueno (ácido p-toluico) (patente estadounidense 2011/0207185, WO 2011/094131, patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624), (2-hidroxi-3-metil-4-oxobutoxi) fosfonato (patente estadounidense 2011/0207185, WO 2011/094131, patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624), etilenglicol (patente estadounidense 2011/0312049, WO 2011/130378, WO 2012/177983), propileno (patente estadounidense 2011/0269204, WO 2011/137198, patente estadounidense 2012/0329119, patente estadounidense 2013/0109064, WO 2013/028519), butadieno (1,3-butadieno) (patente estadounidense 2011/0300597, WO 2011/140171, patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624, patente estadounidense 2012/0225466, WO 2012 / 106516, patente estadounidense 2013/0011891, WO 2012/177710, patente estadounidense 2013/0109064, WO 2013/028519), tolueno (patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624), benceno (patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624), (2-hidroxi-4-oxobutoxi) fosfonato (patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624), benzoato (ácido benzoico) (patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624), estireno (patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624), 2,4-pentadienoato (patente estadounidense 2012/0021478, WO 2012/018624, patente estadounidense 2013/0109064, WO 2013/028519), 3-buteno-1-ol (patente estadounidense 2012 / 0021478, WO 2012/018624, patente estadounidense 2013/0109064, WO 2013/028519), 3-buteno-2-ol (patente estadounidense 2013/0109064, WO 2013/028519), 1,4-ciclohexanodimetanol (patente estadounidense 2012/0156740, WO 2012/082978), alcohol crotilico (patente estadounidense 2013/0011891, WO 2012/177710, patente estadounidense 2013/0109064, WO 2013/028519), alqueno (patente estadounidense 2013/0122563, WO 2013/040383) o la ruta de la caprolactona (patente estadounidense 2013/0144029, documento WO 2013/067432). Las patentes y publicaciones de solicitudes de patentes listadas anteriormente describen rutas de compuestos bioderivados.

La invención proporciona adicionalmente un organismo microbiano no natural que tiene una modificación genética que aumenta la disponibilidad de adenosintrifosfato (ATP). La modificación genética que aumenta la disponibilidad de ATP puede ser única o realizarse en combinación con cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento, incluida, por ejemplo, una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP en un organismo microbiano que no lo produzca naturalmente y con una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato como se describió anteriormente. Por lo tanto, la invención también proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato, y además tiene una modificación genética que aumenta la disponibilidad de adenosina trifosfato (ATP) en el organismo microbiano. La modificación genética que aumenta la disponibilidad de ATP puede incluir el aumento de la expresión de NADH deshidrogenasa Ndh-I, citocromo bo oxidasa o tanto NADH deshidrogenasa Ndh-I como citocromo bo oxidasa.

La atenuación de uno o más genes que catalizan la conversión de succinil-CoA a succinato en el ciclo oxidativo de TCA puede conducir a una reducción en la tasa de crecimiento en algunos fondos de cepas debido a limitaciones de energía o redox. Este defecto de crecimiento puede superarse mediante estrategias de conservación de carbono que aumenten la disponibilidad de ATP o mejoren el rendimiento energético o la eficiencia energética de la cepa.

Dichas estrategias incluyen, por ejemplo, (1) diseñar la cadena de transporte de electrones y (2) sustituir o suplementar la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) con fosfoenolpiruvato carboxiquinasa generadora de ATP (PEPCK). Cada estrategia se describe con más detalle a continuación. Además de su uso en organismos microbianos del huésped que tienen atenuación de una enzima del ciclo TCA, cada una de estas modificaciones genéticas es aplicable de manera similar para aumentar el ATP o mejorar el rendimiento energético o la eficiencia energética de los organismos microbianos del huésped que genera un compuesto bioderivado a partir de un sustrato que no sea un ciclo TCA intermedio o sustrato.

A este respecto, el crecimiento y el rendimiento energético de un organismo microbiano pueden mejorarse mediante la ingeniería de la cadena de transporte de electrones para que sea más eficiente en la producción de ATP. La cadena respiratoria de, por ejemplo, *E. coli* incluye varias NADH deshidrogenasas. Las NADH deshidrogenasas incluyen Ndh-I, Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB en el lado de entrada de los electrones de la cadena respiratoria. La cadena respiratoria, por ejemplo, de *E. coli* también incluye cuatro ubiquinol oxidasas diferentes en el lado de la salida. Las ubiquinol oxidasas incluyen citocromo bo oxidasa, citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa (Bekker et al, J Bacteriol 191: 5510-17 (2009)). Las citocromo oxidasas tienen diferentes eficiencias de conservación de energía. El complejo citocromo bo, codificado por el operón cyo, bombea activamente electrones sobre la membrana y produce una estequiometría  $H + / 2e$  de 4. El complejo del citocromo bd-I no parece bombear activamente protones, pero debido a la oxidación del quinol en el lado periplásmico de la membrana y la posterior absorción de protones desde el lado citoplasmático de la membrana, que se utilizan en la formación de agua, la transferencia neta de electrones da como resultado una estequiometría  $H + / 2e$  de 2. Esta oxidasa está codificada por el operón cyd. Hasta hace poco, no se conocía la estequiometría de translocación de protones de la citocromo bd-II oxidasa, codificada por appBC, pero ahora se ha descrito que esta oxidasa no es electrogénica (Bekker et al, supra). YgiN tampoco es electrogénico (Portnoy et al, AEM 74: 7561-69 (2008)). Las NADH deshidrogenasas también tienen diferentes eficiencias de conservación de energía y solo Ndh-1, codificado por nuo, transloca los protones. La NADH deshidrogenasa I (nuo) y la citocromo bo oxidasa codificada por cyoABCDE son los componentes más eficientes de esta cadena, y cada uno transloca cuatro protones por par de electrones transferidos. La eficiencia energética de la cadena respiratoria es máxima cuando la cadena de transporte de electrones utiliza la citocromo oxidasa Cyo y la NADH deshidrogenasa Nuo. Por lo tanto, se puede optimizar el nivel de expresión de Cyo y / o Nuo para aumentar la eficiencia de la cadena de transporte de electrones y el crecimiento y el rendimiento energético de los organismos.

Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que hay una variedad de enfoques diferentes que pueden emplearse para aumentar la eficiencia de la cadena de transporte de electrones y, por lo tanto, aumentar el crecimiento celular y el rendimiento energético. Un enfoque implica aumentar la expresión de NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo) y / o aumentar la expresión de citocromo bo oxidasa (cyoABCDE). La expresión puede aumentarse mediante, por ejemplo, la sobreexpresión de un gen codificador endógeno y / o la expresión de un ácido nucleico codificador exógeno. La sobreexpresión de un gen endógeno incluye, por ejemplo, la regulación al alza y eliminación de la regulación a la baja como se describe en el presente documento. Por referencia a la expresión de un ácido nucleico codificador exógeno con fines ilustrativos, un enfoque, que puede emplearse para aumentar la eficiencia de la cadena de transporte de electrones, implica la expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica NADH deshidrogenasa Ndh-I o citocromo bo oxidasa. Un enfoque alternativo implica la expresión de uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican tanto una NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo) como la citocromo bo oxidasa (cyoABCDE). La expresión exógena o la sobreexpresión endógena de una o ambas de estas enzimas de la cadena de transporte de electrones aumentará su disponibilidad para el transporte de electrones y, por lo tanto, aumentará su eficiencia. Como se describe más adelante, hay otros métodos disponibles para aumentar la expresión de un ácido nucleico endógeno o exógeno que incluyen, por ejemplo, la incorporación de promotores más fuertes y / o elementos reguladores positivos de los ácidos nucleicos codificadores endógenos, los ácidos nucleicos codificadores exógenos o ambos. Los expertos en la materia apreciarán que algunos o todos estos métodos pueden usarse solos o en combinación para aumentar la expresión de un ácido nucleico codificante.

Los aumentos en la eficiencia del transporte de electrones y la generación de ATP también se pueden obtener, por ejemplo, mediante la atenuación de una o más, incluidas todas, las NADH deshidrogenasas endógenas restantes o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas. De manera similar, la atenuación de una o más, incluidas todas, las restantes ubiquinol oxidasas endógenas también se puede generar para aumentar la eficiencia. Del mismo modo, la incorporación de una atenuación de una o más, incluidas todas, las restantes NADH deshidrogenasas y NAD(P)H: quinina oxidorreductasas y una o más, incluidas todas, las ubiquinol oxidasas restantes pueden aumentar de manera similar las eficiencias. La atenuación puede ser una modificación génica u otra modificación genética descrita en este documento o habitual en la técnica que dé como resultado una disminución de la expresión génica o la actividad del producto génico. Tales métodos incluyen, por ejemplo, modificar un promotor, una región reguladora o un regulador de la expresión génica del gen codificador.

Las restantes NAD(P)H deshidrogenasas o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas implicadas en el transporte de electrones incluyen NAD(P)H deshidrogenasas o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB (NADH deshidrogenasas no Ndh-I). La una o más de estas deshidrogenasas u oxidorreductasas pueden atenuarse para aumentar la eficacia del transporte de electrones y aumentar el rendimiento de ATP porque daría como resultado un mayor transporte de electrones a través de Ndh-I. Por consiguiente, los organismos

microbianos de la invención pueden sufrir la atenuación de una o más de Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor o MdaB, incluida la atenuación de todas estas NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas. De manera similar, un organismo microbiano de la invención puede tener atenuaciones para todas las combinaciones de las siete NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas anteriores que incluyen, por ejemplo, atenuaciones para todas las combinaciones de dos, tres, cuatro, cinco y seis NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas. Se puede generar una atenuación de una o más NADH deshidrogenasas no Ndh-I como se describe anteriormente en un organismo microbiano de la invención, ya sea solo para aumentar la eficiencia del transporte de electrones y la disponibilidad de ATP o se puede usar junto con una mayor expresión de NADH deshidrogenasa Ndh-I, citocromo bo oxidasa o ambas NADH deshidrogenasa Ndh-I y citocromo bo oxidasa como se describió anteriormente.

Las ubiquinol oxidasas endógenas restantes involucradas en el transporte de electrones incluyen citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa (no citocromo bo oxidasas). El gen que codifica una o más de estas oxidasas se puede interrumpir para aumentar la eficiencia del transporte de electrones y aumentar el rendimiento de ATP porque dicha atenuación o interrupciones darían como resultado un mayor transporte de electrones a través de la citocromo bo oxidasa. Por consiguiente, los organismos microbianos de la invención pueden tener una atenuación de una o más de la citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa o quinol monooxigenasa, incluida una atenuación para todas estas ubiquinol oxidasas. De manera similar, un organismo microbiano de la invención puede tener atenuaciones para todas las combinaciones de las tres ubiquinol oxidasas anteriores que incluyan, por ejemplo, atenuaciones para todas las combinaciones de dos ubiquinol oxidasas. Se puede generar una atenuación de una o más bo oxidasas no citocromo como se describió anteriormente en un organismo microbiano de la invención, ya sea solo para aumentar la eficiencia del transporte de electrones y la disponibilidad de ATP o se puede usar junto con una mayor expresión de NADH deshidrogenasa Ndh-I, citocromo bo oxidasa o ambas NADH deshidrogenasa Ndh-I y citocromo bo oxidasa como se describió anteriormente.

Al igual que con las atenuaciones de algunas o todas las NAD(P)H deshidrogenasas endógenas o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas distintas de Ndh-I (es decir, las NADH deshidrogenasas no Ndh-I) o algunas o todas las ubiquinol oxidasas distintas que las citocromo bo oxidasas (es decir, las citocromo bo oxidasas), se pueden generar atenuaciones para una o más de una deshidrogenasa NADH no Ndh-I y una bo oxidasas no citocromo para aumentar la eficiencia del transporte de electrones y aumentar el rendimiento de ATP porque tales atenuaciones darían como resultado un mayor transporte de electrones a través de la NADH deshidrogenasa Ndh-I y la citocromo bo oxidasa. En consecuencia, los organismos microbianos de la invención pueden tener una atenuación de una o más de Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor o MdaB, incluida una atenuación para todas estas NAD(P)H deshidrogenasas y NAD(P)H: quinina oxidorreductasas, y una atenuación de una o más de las citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa o quinol monooxigenasa, incluida una atenuación de todas estas ubiquinol oxidasas. Una combinación ejemplar incluye la atenuación de Ndh-II, bd-I oxidasa o Ndh-II y bd-I oxidasa. De manera similar, un organismo microbiano de la invención puede tener atenuaciones para todas las combinaciones de las siete NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas anteriores que incluyen, por ejemplo, atenuaciones para todas las combinaciones de dos, tres, cuatro, cinco y seis NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas, y pueden tener atenuaciones para todas las combinaciones de las tres ubiquinol oxidasas anteriores, incluidas, por ejemplo, atenuaciones para todas las combinaciones de dos ubiquinol oxidasas. Se puede generar una atenuación de una o más NADH deshidrogenasas no Ndh-I y / o bo oxidasas no citocromo como se describió anteriormente en un organismo microbiano de la invención, ya sea solo para aumentar la eficiencia del transporte de electrones y la disponibilidad de ATP o se puede usar junto con un aumento de la expresión de NADH deshidrogenasa Ndh-I, citocromo bo oxidasa o tanto NADH deshidrogenasa Ndh-I como citocromo bo oxidasa como se describió anteriormente.

Los ejemplos de NADH deshidrogenasas no Ndh-I y bo oxidasas no-citocromo que son útiles para la atenuación para mejorar la eficiencia energética de la cadena de transporte de electrones y, por lo tanto, aumentar la disponibilidad de ATP se resumen en la Tabla 14 a continuación.

Tabla 14. NADH deshidrogenasas no Ndh-I ejemplares y bo oxidasas no citocromo

Nombre del gen	Nº entrada Genbank	Nº GI	Organismo
appB	NP_415498.1	16128945	Escherichia coli
appC	NP_415497.1	16128944	Escherichia coli
ygiN	NP_417501.1	16130925	Escherichia coli
mdaB	NP_417500.1	16130924	Escherichia coli
wrbA	P0A8G6.2	67475535	Escherichia coli
yieF	P0AGE6.1	84028020	Escherichia coli

Qor	NP_418475.1	16131877	Escherichia coli
ytfG	NP_418632.1	16132033	Escherichia coli
cydA	NP_415261.2	90111166	Escherichia coli
cydB	NP_415262.1	16128709	Escherichia coli
ndh	NP_415627.1	16129072	Escherichia coli

La invención también proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol o dimetilmenaquinol. La atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol o dimetilmenaquinol puede ser única o en combinación con cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol o dimetilmenaquinol en un organismo microbiano de origen no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato como se describió anteriormente. Por lo tanto, la invención también proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato, y además tiene una atenuación de uno o más menaquinol o enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol. La atenuación puede ser la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol, una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol o una o más enzimas biosintéticas de menaquinol y una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol. La atenuación puede ser una modificación génica u otra modificación genética descrita en este documento o habitual en la técnica que dé como resultado una disminución de la expresión génica o la actividad del producto génico. Tales métodos incluyen, por ejemplo, modificar un promotor, una región reguladora o un regulador de la expresión génica del gen codificador. Los genes que codifican enzimas biosintéticas de menaquinol y dimetilmenaquinol ejemplares se exponen en la Tabla 15.

Una modificación genética relacionada que puede emplearse para mejorar la eficiencia de la cadena de transporte de electrones y aumentar los rendimientos de ATP es modificar la composición del grupo de quinonas de tal manera que aumenten los grupos totales de ubiquinona y ubiquinol y disminuyan los grupos de menaquinona y menaquinol. La composición del grupo de quinonas puede regularse por la disponibilidad de oxígeno (Shestopalov et al, FEBS Lett 404: 2-3: 272-4 (1997)). Cyo y Cyd pueden oxidar el ubiquinol. Sin embargo, Cyd también puede oxidar el menaquinol, mientras que Cyo exhibe poca actividad para el menaquinol. Por lo tanto, la interrupción de la biosíntesis de menaquinona y / o menaquinol se puede utilizar para aumentar el flujo a través de Cyo al cambiar la distribución del grupo de quinonas a ubiquinona y ubiquinol, lo que conduce a una respiración más eficiente energéticamente.

En la Tabla 15 a continuación se resumen ejemplos de enzimas biosintéticas de menaquinona que son útiles para la atenuación para mejorar la eficiencia energética de la cadena de transporte de electrones y, por lo tanto, aumentar la disponibilidad de ATP.

Tabla 15. Enzimas biosintéticas de menaquinona ejemplares

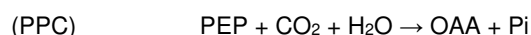
Nombre del gen	Nº entrada Genbank	Nº GI	Organismo
menF	NP_416768.4	90111411	Escherichia coli
menD	NP_416767.1	16130199	Escherichia coli
menH	YP_026269.1	49176426	Escherichia coli
menC	NP_416764.1	16130196	Escherichia coli
menE	NP_416763.1	16130195	Escherichia coli
menB	NP_416765.1	16130197	Escherichia coli
menI	AAC74756.1	1787976	Escherichia coli
menA	NP_418365.1	16131768	Escherichia coli
menG	YP_026269.1	49176426	Escherichia coli



La invención también proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) suplementada o sustituida con una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa generadora de ATP (PEPCK; también denominada PPCK). La sustitución o la suplementación pueden ser únicas o hacerse en combinación con cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, sustituir o  
 5 suplementar PPC con una PEPCK generadora de ATP en un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato como se describe en este documento. Por lo tanto, la invención también proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o una enzima productora de succinato, y  
 10 además tiene un PPC suplementado o sustituido con un PEPCK que genera ATP.

Otra modificación genética que puede emplearse para aumentar la disponibilidad de ATP en los organismos microbianos del huésped de la invención incluye la sustitución o suplementación de PPC con una PEPCK fosfoenolpiruvato carboxiquinasa generadora de ATP.

A modo de ejemplo en *E. coli*, por ejemplo, dos enzimas catalizan la interconversión de fosfoenolpiruvato (PEP) y oxaloacetato. Una enzima corresponde a PEP carboxilasa (PPC, EC 4.1.1.31) y la segunda enzima corresponde a PEP carboxiquinasa (PPCK, EC 4.1.1.49). Las reacciones catalizadas por cada una de estas enzimas se resumen en las fórmulas a continuación.



Como se ilustra y describe anteriormente, las enzimas PPC y PEPCK catalizan la carboxilación de PEP a oxaloacetato. La formación de oxaloacetato a través de PEPCK genera ATP, que mejora la disponibilidad de ATP en las cepas del ciclo TCA interrumpidas y no interrumpidas. La actividad de PEPCK puede sustituir a la actividad de PPC o puede complementarla (suplementarla). Ejemplos de enzimas PEPCK se describen con más detalle a continuación. Los expertos en la materia también sabrán que la suplementación del medio en los métodos descritos en este documento con bicarbonato, aspartato o CO<sub>2</sub> en exceso que pueden ser útiles para lograr mayores tasas de crecimiento.

La suplementación de PPC incluye, por ejemplo, la sobreexpresión de un ácido nucleico que codifica PEPCK endógeno y / o la expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica PEPCK. La sobreexpresión incluye, por ejemplo, la regulación al alza y la eliminación de la regulación a la baja como se describe en este documento. Como con cualquier expresión de un ácido nucleico codificador exógeno descrito en el presente documento, el ácido nucleico exógeno puede ser un ácido nucleico codificador que sea homólogo al organismo microbiano del huésped o puede ser un ácido nucleico codificador que es heterólogo al huésped. La sustitución de PPC incluye, por ejemplo, la atenuación de PPC endógeno y la sobreexpresión de un ácido nucleico que codifica PEPCK endógeno y / o la expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica PEPCK. La atenuación puede ser una modificación génica u otra modificación genética descrita en este documento o habitual en la técnica que dé como resultado una disminución de la expresión génica o la actividad del producto génico. Tales métodos incluyen, por ejemplo, modificar un promotor, una región reguladora o un regulador de la expresión génica del gen codificador.

Como se describe más adelante, varios métodos también están disponibles para aumentar la expresión de un ácido nucleico endógeno o exógeno que incluyen, por ejemplo, la incorporación de promotores más fuertes y / o elementos reguladores positivos de los ácidos nucleicos codificadores endógenos, los ácidos nucleicos codificadores exógenos o ambos. Los expertos en la materia apreciarán que algunos o todos estos métodos pueden usarse solos o en combinación para aumentar la expresión de un ácido nucleico codificante.

Con respecto a las enzimas PEPCK ejemplares, las enzimas PEPCK de *S. cerevisiae* y *Escherichia coli* están codificadas por PCK1 y pckA, respectivamente (Valdes-Hevia et al., FEBS. Lett. 258:313-316 (1989); Kim et al., Appl Environ Microbiol 70: 1238-1241 (2004)). La PEPCK de *E. coli* es principalmente activa durante la gluconeogénesis. Sin embargo, la actividad de PEPCK de *E. coli* endógena de PEP hacia oxaloacetato se ha demostrado en mutantes ppc de K-12 de *E. coli* (Kwon et al., J Micro Biotech 16: 1448-1452 (2006)). Estas cepas no exhibieron defectos de crecimiento y aumentaron la producción de succinato a altas concentraciones de NaHCO<sub>3</sub>. Por lo tanto, la sustitución de PPC con PEPCK se puede utilizar para mejorar aún más la generación de ATP. Un diseño metabólico alternativo para mejorar la generación de ATP a través de PEPCK puede incluir reducir la afinidad por el oxaloacetato. Por ejemplo, la actividad de la enzima PEPCK de *E. coli* en la dirección de consumo de oxaloacetato puede reducirse mediante la introducción de una sustitución de aminoácidos en el sitio de unión de oxaloacetato (pck R65Q) (Cotelesage et al., Int. J. Biochem. Cell Biol. 39:1204-1210 (2007)). En algunos organismos, particularmente las bacterias del rumen, PEPCK es bastante eficiente en la producción de oxaloacetato a partir de PEP y en la generación de ATP. Tales enzimas PEPCK eficientes también son aplicables para su uso en los organismos microbianos de la invención que se modifican para aumentar la producción de ATP. Los ejemplos de genes PEPCK que se han clonado en *E. coli* y que son igualmente aplicables para su uso en los organismos microbianos de la invención incluyen los de *Mannheimia succiniciproducens* (Lee et al., Biotechnol. Bioprocess Eng. 7:95-99 (2002)), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Laivenieks et al., Appl Environ Microbiol 63: 2273-2280 (1997)) y

Actinobacillus succinogenes (Kim et al., Appl Environ Microbiol 70: 1238-1241 (2004)). La enzima PEPCK de Megathyrus maximus tiene un Km bajo para CO<sub>2</sub>, un sustrato que se cree que limita la velocidad en la enzima de E. coli (Chen et al., Plant Physiol 128: 160-164 (2002); Cotelesage et al., Int. J. Biochem. Cell Biol. 39:1204-1210 (2007)). Otro candidato enzimático es la enzima PEPCK de la gripe Haemophilus. Ejemplos de enzimas PEPCK se resumen en la Tabla 16 a continuación.

5

Tabla 16. Enzimas PEPCK ejemplares

Proteína	ID Genbank	Nº GI	Organismo
PCK1	NP_013023	6322950	Saccharomyces cerevisiae
pck	NP_417862.1	16131280	Escherichia coli
pckA	YP_089485.1	52426348	Mannheimia succiniciproducens
pckA	O09460.1	3122621	Anaerobiospirillum succiniciproducens
pckA	Q6W6X5	75440571	Actinobacillus succinogenes
AF532733.1:1..1929	AAQ10076.1	33329363	Megathyrus maximus
pckA	P43923.1	1172573	Haemophilus influenza

La atenuación o la reducción de la expresión, que incluye, por ejemplo, la modificación génica de un ácido nucleico codificador para enzimas PPC endógenas, puede ser beneficioso para prevenir o reducir un ciclo de consumo de ATP con PEPCK y para garantizar que PEPCK sea la principal fuente de oxaloacetato. Las enzimas PPC ejemplares están codificadas por ppc en E. coli (Kai et al., Arch. Biochem. Biophys 414: 170-179 (2003), ppcA en Methylobacterium extorquens AM1 (Arps et al., J. Bacteriol. 175: 3776-3783 (1993), y ppc en Corynebacterium glutamicum (Eikmanns et al., Mol. Gen. Genet. 218:330-339 (1989). Las enzimas PPC ejemplares se resumen en la Tabla 17 a continuación.

10

15 Tabla 17. Enzimas ejemplares de PPC

Proteína	ID Genbank	Nº GI	Organismo
Ppc	NP 418391	16131794	Escherichia coli
ppcA	AAB58883	28572162	Methylobacterium extorquens
Ppc	ABB53270	80973080	Corynebacterium glutamicum

La actividad formadora de oxaloacetato de PEPCK o PPC en un organismo microbiano huésped de la invención, que incluye un huésped que tiene una actividad reducida de succinil-CoA a succinato, puede incrementarse mediante la sobreexpresión de PEPCK y / o PPC. La actividad de PEPCK puede mejorarse aún más aumentando la disponibilidad de PEP intracelular. Este aumento puede lograrse, por ejemplo, mediante la interrupción del sistema PTS de glucosa y / o aumentando la expresión de un sistema que no es PTS, como glucosa permeasa, facilitador de glucosa o transportador ABC de glucosa. Otra estrategia para aumentar la PEP intracelular es atenuar la piruvato quinasa que cataliza la conversión dependiente de ADP de fosfoenolpiruvato a piruvato. Las atenuaciones y los aumentos anteriores en la expresión génica pueden ocurrir por cualquiera de los métodos descritos en este documento, que incluyen, por ejemplo, la modificación génica de uno o más genes codificadores para interrumpir un sistema PTS y / o piruvato quinasa y por la sobreexpresión de un gen endógeno o la expresión de un ácido nucleico codificador exógeno para aumentar la expresión de los genes ejemplificados anteriormente. En la Tabla 18 a continuación se muestran ejemplos de genes cuya modificación podría mejorar la conversión de PEP a oxaloacetato en una cepa con actividad reducida de succinil-CoA a succinato.

20

25

30 Tabla 18. Genes ejemplares cuya interrupción mejora la conversión de PEP a oxaloacetato

Proteína	ID Genbank	Nº GI	Organismo
pykA	NP_416368.1	16129807	Escherichia coli
pykF	NP_416191.1	16129632	Escherichia coli

ptsI	NP_416911.1	16130342	Escherichia coli
ptsH	NP_416910.1	16130341	Escherichia coli
Crr	NP_416912.1	16130343	Escherichia coli
ptsG	NP_415619.1	16129064	Escherichia coli
manX	NP_416331.1	16129771	Escherichia coli
manY	NP_416332.1	16129772	Escherichia coli
manZ	NP_416333.4	345452720	Escherichia coli

Los organismos microbianos no naturales de la invención incluyen todas las combinaciones y permutaciones de las modificaciones genéticas descritas en este documento. Por lo tanto, como se establece en el presente documento con respecto a ciertas combinaciones ejemplares de modificaciones genéticas, cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento se puede combinar con una o más modificaciones genéticas descritas en el presente documento para generar un organismo microbiano no natural que tiene una o más de las características metabólicas resultantes de éste. Las combinaciones de diferentes modificaciones genéticas pueden incluir, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve o más combinaciones de modificaciones genéticas, incluido un organismo microbiano que tiene cualquier cantidad de modificaciones genéticas descritas en este documento hasta una combinación de todas las modificaciones genéticas descritas en este documento. En consecuencia, algunas de las diversas combinaciones de modificaciones genéticas se ejemplifican a continuación con fines ilustrativos. Sin embargo, dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que todas las demás combinaciones no ejemplificadas anteriormente o a continuación se incluyen dentro de la invención tal como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, en una realización ejemplar, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de YciA CoA hidrolasa y una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un intermedio de ciclo TCA o un sustrato del ciclo TCA. El sustrato intermedio del ciclo TCA o sustrato del sustrato del ciclo TCA puede ser, por ejemplo,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA y / o acetil-CoA. El organismo microbiano de origen no natural puede incluir además, por ejemplo, la expresión de un ácido nucleico exógeno que codifique una piridin-nucleótido transhidrogenasa. El ácido nucleico exógeno que codifica la piridin-nucleótido transhidrogenasa puede ser, por ejemplo, pntAB.

El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de YciA CoA hidrolasa y una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un ciclo intermedio de TCA o sustrato del ciclo de TCA puede incluir, por ejemplo, la atenuación de una enzima del ciclo de TCA. El compuesto bioderivado producido a partir de un intermedio del ciclo TCA o sustrato del ciclo TCA puede incluir, por ejemplo, 4HB, 1,4-BDO, 1,3-BDO, PHB, butadieno, adipato, 6-aminocaproato, caprolactama, ácido metacrílico, isopropanol, alcoholes de cadena larga, hexametilendiameno, metacrilato de metilo, butanol, 3-buteno-1-ol, 3-buteno-2-ol y alcohol crotilico.

El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de hidrolasa YciA y una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un ciclo intermedio de TCA o sustrato del ciclo de TCA puede incluir, por ejemplo, una modificación genética que aumente la disponibilidad de adenosintrifosfato (ATP) en el organismo microbiano. La modificación genética puede ser, por ejemplo, un aumento de la expresión de NADH deshidrogenasa Ndh-I, citocromo bo oxidasa o tanto NADH deshidrogenasa Ndh-I como citocromo bo oxidasa y puede incluir, por ejemplo, la expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica la NADH deshidrogenasa Ndh- I (nuo), citocromo bo oxidasa (cyoABCDE) o ambos NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo) y citocromo bo oxidasa (cyoABCDE).

El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de hidrolasa YciA y una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un intermedio del ciclo de TCA o sustrato del ciclo de TCA puede incluir, solo o en combinación con una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP, la atenuación de una o más NAD(P)H deshidrogenasas o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas seleccionadas de Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB, la atenuación de una o más ubiquinol oxidasas seleccionadas del citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa o la atenuación de una o más NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas seleccionadas del grupo que consiste en Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB y / o la atenuación de una o más ubiquinol oxidasa seleccionadas del grupo que consiste en citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa.

El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de YciA hidrolasa y una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un intermedio del ciclo de TCA o sustrato del ciclo de TCA puede incluir, solo o en combinación con una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP, la

atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol o la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol.

5 El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de hidrolasa YciA y una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un intermedio del ciclo de TCA o sustrato del ciclo de TCA puede incluir, solo o en combinación con una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP, una modificación genética que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en el organismo microbiano. La mayor expresión de PEPCK puede deberse a la mayor expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica PEPCK.

10 El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de hidrolasa YciA y una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un intermedio del ciclo de TCA o sustrato del ciclo de TCA puede incluir, solo o en combinación con una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP, la atenuación de una fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) en el organismo microbiano. En otra realización, el organismo microbiano puede comprender además una modificación genética que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fosfenolpiruvato carboxilasa (PPC), o una combinación de los mismos en el organismo microbiano. Dicho organismo microbiano puede comprender además la atenuación de una piruvato quinasa o un sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS). En otra realización más, el organismo microbiano no natural puede comprender además la atenuación de proteínas que codifican ClpA, piruvato quinasa o el sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS) (ver ejemplos).

20 Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en este documento, los expertos en la materia comprenderán que cualquiera de las combinaciones de modificaciones genéticas anteriores se puede combinar adicionalmente con cualquier otra modificación genética única o múltiple descrita en este documento.

En una realización ejemplar adicional, la invención proporciona un organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de una YciA CoA hidrolasa y que tiene un ácido nucleico exógeno que codifica una piridin-nucleótido transhidrogenasa. La piridin-nucleótido transhidrogenasa puede ser pntAB.

25 El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de una YciA CoA hidrolasa y que tiene un ácido nucleico exógeno que codifica una piridin-nucleótido transhidrogenasa puede incluir además, por ejemplo, una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP en el organismo microbiano. La modificación genética puede ser, por ejemplo, un aumento de la expresión de NADH deshidrogenasa Ndh-I, citocromo bo oxidasa o ambas NADH deshidrogenasa Ndh-I y citocromo bo oxidasa y puede incluir, por ejemplo, la expresión de un ácido nucleico exógeno que codifique la NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo), citocromo bo oxidasa (cyoABCDE) o tanto NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo) como citocromo bo oxidasa (cyoABCDE).

30 El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de una YciA CoA hidrolasa y que tiene un ácido nucleico exógeno que codifica una piridin-nucleótido transhidrogenasa puede incluir, solo o en combinación con una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP, la atenuación de una o más NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas seleccionadas de Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB, la atenuación de una o más ubiquinol oxidasas seleccionadas de citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa o una atenuación de una o más NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidorreductasas seleccionadas del grupo que consiste en Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB y la atenuación de una o más ubiquinol oxidasas seleccionadas del grupo que consiste en citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa.

35 El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de una YciA CoA hidrolasa y que tiene un ácido nucleico exógeno que codifica una piridin-nucleótido transhidrogenasa puede incluir, solo o en combinación con una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP, la atenuación de uno o más enzimas biosintéticas de menaquinol, la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol o la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol y la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol.

40 El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de una YciA CoA hidrolasa y que tiene un ácido nucleico exógeno que codifica una piridin-nucleótido transhidrogenasa puede incluir, solo o en combinación con una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP, la atenuación de uno o más enzimas biosintéticas de menaquinol, la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol o la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol y la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol.

45 El organismo microbiano no natural que tiene una atenuación de una YciA CoA hidrolasa y que tiene un ácido nucleico exógeno que codifica una piridin-nucleótido transhidrogenasa puede incluir, solo o en combinación con una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP, una modificación genética que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en el organismo microbiano. La expresión aumentada de PEPCK puede deberse a la mayor expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica PEPCK.

50 El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de un gen que codifica una YciA CoA hidrolasa y que tiene un ácido nucleico exógeno que codifica una piridin-nucleótido transhidrogenasa puede incluir, solo o en combinación con una modificación genética que aumente la disponibilidad de ATP, la atenuación de una fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) en el organismo microbiano. En otra realización, el organismo microbiano puede comprender además una modificación genética que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fosfenolpiruvato carboxilasa (PPC), o una combinación de los mismos en el organismo microbiano. Dicho organismo microbiano puede comprender además la atenuación de una piruvato quinasa o un

sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS). En otra realización más, el organismo microbiano no natural puede comprender además la atenuación de proteínas que codifican ClpA, piruvato quinasa o el sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS) (ver ejemplos).

5 Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que cualquiera de las combinaciones anteriores de modificaciones genéticas se puede combinar además con cualquier otra modificación genética única o múltiple descrita en el presente documento.

En otra realización ejemplar más, la invención proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una modificación genética que aumenta la expresión de una NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo), citocromo bo oxidasa (cyoABCDE) o ambas NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo) y citocromo bo oxidasa (cyoABCDE).

10 El organismo microbiano no natural puede incluir además la atenuación de uno o más ácidos nucleicos endógenos que codifican una NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidoreductasas seleccionadas de Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB, la atenuación de una o más ubiquinol oxidasas seleccionadas de citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa o la atenuación de una o más NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidoreductasas seleccionadas del grupo que consiste en Ndh-II, WrbA,  
15 YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB y la atenuación de una o más ubiquinol oxidasa seleccionadas del grupo que consiste en citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa.

El agente microbiano no natural que tiene una modificación genética que aumenta la expresión de una NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo), citocromo bo oxidasa (cyoABCDE) o ambas NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo) y citocromo bo oxidasa (cyoABCDE) puede incluir además, por ejemplo, la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol, la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetil menaquinol o la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol y la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetil menaquinol.  
20

El organismo microbiano no natural que tiene una modificación genética que aumenta la expresión de NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo), citocromo bo oxidasa (cyoABCDE) o ambos NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo) y citocromo bo oxidasa (cyoABCDE) puede incluir además, por ejemplo, una modificación genética que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en el organismo microbiano. La mayor expresión de PEPCK puede deberse a la mayor expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica PEPCK.  
25

El organismo microbiano no natural que tiene una modificación genética que aumenta la expresión de una NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo), citocromo bo oxidasa (cyoABCDE) o ambas NADH deshidrogenasa Ndh-I (nuo) y citocromo bo oxidasa (cyoABCDE) puede incluir además, por ejemplo, la atenuación de una fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) en el organismo microbiano. En otra realización, el organismo microbiano puede comprender además una modificación genética que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fosfenolpiruvato carboxilasa (PPC), o una combinación de los mismos en el organismo microbiano. Dicho organismo microbiano puede comprender además la atenuación de una piruvato quinasa o un sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS). En otra realización más, el organismo microbiano no natural puede comprender además la atenuación de proteínas que codifican ClpA, piruvato quinasa o el sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS) (ver ejemplos). En otra realización, el organismo microbiano de origen no natural puede comprender además una modificación genética seleccionada de la atenuación de la proteína codificada por cydA o cyB y / o pykF, una modificación genética que aumente la expresión de pntAB, o una combinación de las mismas.  
30  
35

40 Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que cualquiera de las combinaciones anteriores de modificaciones genéticas puede combinarse adicionalmente con cualquier otra modificación genética única o múltiple descrita en el presente documento.

En otra realización ejemplar más, la invención proporciona un organismo microbiano no natural que tiene atenuación de una o más deshidrogenasas de NAD(P)H y / o NAD(P)H: quinina oxidoreductasas seleccionadas de Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB (es decir, una NADH no Ndh-I deshidrogenasa), la atenuación de una o más ubiquinol oxidasas seleccionadas entre citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa (es decir, una no citocromo bo oxidasa) o la atenuación de una o más NAD(P)H deshidrogenasas y / o NAD(P)H: quinina oxidoreductasas seleccionadas del grupo que consiste en Ndh-II, WrbA, YhdH, YieF, YtfG, Qor y MdaB y la atenuación de una o más ubiquinol oxidasas seleccionadas del grupo que consiste en citocromo bd-I oxidasa, citocromo bd-II oxidasa y quinol monooxigenasa.  
45  
50

El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de una o más NADH no Ndh-I deshidrogenasa y / o una no citocromo bo oxidasa puede incluir además, por ejemplo, la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol, la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol o la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol y la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol.  
55

El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de una o más NADH no Ndh-I deshidrogenasa y / o una no citocromo bo oxidasa puede incluir además, por ejemplo, una modificación genética

que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en el organismo microbiano. La mayor expresión de PEPCK puede deberse a la mayor expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica PEPCK.

5 El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de una o más NADH no Ndh-I deshidrogenasa y / o una no citocromo bo oxidasa puede incluir además, por ejemplo, la atenuación de una fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) en el organismo microbiano. En otra realización, el organismo microbiano puede comprender además una modificación genética que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fosfenolpiruvato carboxilasa (PPC), o una combinación de los mismos en el organismo microbiano. Dicho organismo microbiano puede comprender además la atenuación de una piruvato quinasa o un sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS). En otra realización más, el organismo microbiano no natural puede comprender además la atenuación de proteínas que codifican ClpA, piruvato quinasa o sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS) (ver ejemplos).

Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que cualquiera de las combinaciones anteriores de modificaciones genéticas puede combinarse adicionalmente con cualquier otra modificación genética única o múltiple descrita en este documento.

15 En una realización ejemplar adicional, la invención proporciona un organismo microbiano no natural que tiene una atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol, la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol o la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de menaquinol y la atenuación de una o más enzimas biosintéticas de dimetilmenaquinol.

20 El organismo microbiano de origen no natural que tiene una atenuación de uno o más ácidos nucleicos endógenos que codifican una enzima biosintética de menaquinol y / o dimetilmenaquinol puede incluir además, por ejemplo, una modificación genética que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en el organismo microbiano. La mayor expresión de PEPCK puede deberse a la mayor expresión de un ácido nucleico exógeno que codifica PEPCK.

25 El organismo microbiano no natural que tiene una atenuación de uno o más enzimas biosintéticas de menaquinol y / o dimetilmenaquinol puede incluir además, por ejemplo, la atenuación de una fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) en el organismo microbiano. En otra realización, el organismo microbiano puede comprender además una modificación genética que aumente la expresión de una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fosfenolpiruvato carboxilasa (PPC), o una combinación de los mismos en el organismo microbiano. Dicho organismo microbiano puede comprender además la atenuación de una piruvato quinasa o un sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS). En otra realización más, el organismo microbiano no natural puede comprender además la atenuación de proteínas que codifican ClpA, piruvato quinasa o el sistema de glucosa fosfotransferasa (PTS) (ver ejemplos).

Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en este documento, los expertos en la materia comprenderán que cualquiera de las combinaciones de modificaciones genéticas anteriores se puede combinar adicionalmente con cualquier otra modificación genética única o múltiple descrita en este documento.

35 A modo de ejemplo con respecto a las diversas combinaciones y permutaciones descritas y ejemplificadas anteriormente, la invención proporciona además un organismo microbiano de origen no natural de cualquiera de las realizaciones ejemplares anteriores, incluyendo cuando el organismo microbiano se selecciona de bacterias, levaduras, hongos u otro microorganismo aplicable a un proceso de fermentación. El organismo microbiano no natural puede ser una bacteria y la bacteria puede ser *Escherichia coli*.

40 Además, a modo de ejemplo, con respecto a las diversas combinaciones y permutaciones descritas y ejemplificadas en este documento, se encuentra un organismo microbiano que no se produce de forma natural, que incluye una modificación genética seleccionada entre: (1) atenuación de *cydA* o *cydB*, y una o más de una modificación genética seleccionada de (a) una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *pntAB*; (b) la atenuación de la proteína codificada por *pykF*; (c) la atenuación de la proteína codificada por *sucCD*; (d) la atenuación de la proteína codificada por *yciA*; (e) una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *ackA* y una proteína codificada por *pta*; (f) una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *cyoB*; (g) la atenuación de la proteína codificada por *pykA*; (h) la atenuación la de la proteína codificada por *arcA*; (i) la atenuación de la proteína codificada por *crr*; (j) la atenuación de la proteína codificada por *clpA*; y (k) la atenuación de la proteína codificada por *menC*; y (2) una modificación genética seleccionada de (a) la atenuación de las proteínas codificadas por *sucCD* y *yciA*; (b) la atenuación de las proteínas codificadas por *sucCD* y *yciA*, y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *pntAB*; (c) la atenuación de las proteínas codificadas por *sucCD* y *yciA*, y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *cyoB*; (d) la atenuación de las proteínas codificadas por *sucCD*, *yciA* y *cydA* o *cydB*, y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *cyoB*; (e) la atenuación de las proteínas codificadas por *sucCD*, *yciA* y *menC* y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *cyoB*; (f) la atenuación de las proteínas codificadas por *sucCD*, *yciA*, *cydA* o *cydB* y *menC* y que tienen un modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *cyoB*; (g) la atenuación de las proteínas codificadas por *sucCD* y *cydA* o *cydB*; (h) la atenuación de las proteínas codificadas por *sucCD* y *cydA* o *cydB* y *pykF*; (i) la

atenuación de las proteínas codificadas por sucCD y cydA o cydB, y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por pntAB; (j) la atenuación de las proteínas codificadas por sucCD y cydA o cydB y pykF, y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por pntAB; (k) la atenuación de las proteínas codificadas por sucCD, yciA y cydA o cydB; (l) la atenuación de las proteínas codificadas por sucCD, yciA y cydA o cydB y pykF; (m) la atenuación de las proteínas codificadas por sucCD, yciA y cydA o cydB, y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por pntAB; (n) la atenuación de las proteínas codificadas por sucCD, yciA y cydA o cydB y pykF, y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por pntAB; (o) la atenuación de las proteínas codificadas por sucCD, yciA y cydA o cydB y menC; (p) la atenuación de las proteínas codificadas por sucCD, yciA y cydA o cydB y menC, y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por pntAB; (q) la atenuación de las proteínas codificadas por sucCD y pykF, y que tienen una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por pntAB; (r) la atenuación de la proteína codificada por clpA; (s) la atenuación de la proteína codificada por menC; (t) la atenuación de la proteína codificada por menC y cydA o cydB; (u) la atenuación de la proteína codificada por pykF y / o pykA; (v) que tiene una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por pntAB; (w) la atenuación de cydA o cydB y sucCD, arcA y crr, y que tiene una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por ackA y pta; (x) la atenuación de cydA o cydB y arcA; (y) la atenuación de cydA o cydB, y que tiene una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por pntAB; (z) la atenuación de cydA o cydB y pykF; y (aa) la atenuación de cydA o cydB y pykF, y que tiene una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por pntAB.

El anterior organismo microbiano que no se produce de forma natural puede incluir además una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un ciclo intermedio TCA o un sustrato del ciclo TCA. El compuesto bioderivado puede ser de 4-hidroxibutirato (4HB), 1,4-butanodiol (1,4-BDO), 1,3-butanodiol (1,3-BDO), polihidroxilbutanoato (PHB), butadieno, adipato, 6-aminocaproato, caprolactama, ácido metacrílico, isopropanol, alcoholes de cadena larga, hexametildiameno, metacrilato de metilo, butanol, 3-buten-1-ol, 3-buten-2-ol y alcohol crotilico. Además, el organismo microbiano puede ser una bacteria y la bacteria puede ser *Escherichia coli*.

Como se describe en este documento, una atenuación es una modificación genética que hace que el producto génico codificado esté inactivo o tenga menor actividad. En algunas realizaciones, la atenuación puede incluir una delección génica completa. En algunas realizaciones, otros métodos para atenuar, incluidos los métodos para modificar un gen, incluyen, por ejemplo, el desplazamiento de marcos por omisión o la adición de oligonucleótidos o por mutaciones que hacen que el gen no funcione. Sin embargo, todo experto en la materia reconocerá la utilidad de las delecciones génicas, debido a la estabilidad que confiere al organismo no natural de volver a un fenotipo parental en el que no se ha producido la atenuación. Aunque se ejemplifica en este documento como modificaciones metabólicas, en particular una o más atenuaciones, se entiende que cualquier atenuación que reduzca o evite la actividad de la actividad metabólica referida puede introducirse en un organismo microbiano huésped, según se desee.

Los organismos microbianos no naturales de la invención que tienen una o más atenuaciones como se describe en el presente documento pueden producirse mediante atenuación o disrupción génica como se describe en el presente documento. Brevemente, dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que para introducir una modificación metabólica como la atenuación de una enzima, puede ser necesario interrumpir la actividad catalítica de una o más enzimas involucradas en la reacción. Alternativamente, una modificación genética puede incluir la modificación de la expresión de una proteína reguladora o cofactor necesario para la actividad enzimática o la actividad máxima. Además, la pérdida genética de un cofactor necesario para una reacción enzimática también puede tener el mismo efecto que una interrupción del gen que codifica la enzima. La interrupción puede ocurrir por una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, la eliminación de un gen codificador o la incorporación de una modificación genética en una o más de las secuencias del gen codificador. Los genes codificadores dirigidos a la disrupción pueden ser uno, algunos o todos los genes que codifiquen las enzimas involucradas en la actividad catalítica. Por ejemplo, cuando una sola enzima está involucrada en una actividad catalítica dirigida, la modificación puede ocurrir por una modificación genética que reduzca o elimine la actividad catalítica del producto genético codificado. De manera similar, cuando la enzima única es multimérica, incluida la heteromérica, puede producirse una modificación genética que reduzca o destruya la función de una o todas las subunidades de los productos genéticos codificados. La destrucción de la actividad se puede lograr mediante la pérdida de la actividad de unión de una o más subunidades requeridas para formar un complejo activo, mediante la destrucción de la subunidad catalítica del complejo multimérico o por ambas. Otras funciones de asociación y actividad de proteínas multiméricas también pueden ser dirigidas para interrumpir una reacción metabólica de la invención. Dichas otras funciones son habituales para los expertos en la materia. De manera similar, una actividad enzimática diana puede reducirse o eliminarse interrumpiendo la expresión de una proteína o enzima que modifica y / o activa la enzima diana, por ejemplo, una molécula requerida para convertir una apoenzima en una holoenzima. Además, algunas o todas las funciones de un único polipéptido o complejo multimérico pueden interrumpirse según la invención para reducir o abolir la actividad catalítica de una o más enzimas involucradas en una reacción o modificación metabólica de la invención. De manera similar, algunas o todas las enzimas involucradas en una reacción o modificación metabólica de la invención pueden interrumpirse siempre que la reacción dirigida se reduzca o elimine.

Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia también comprenderán que una reacción enzimática puede atenuarse reduciendo o eliminando las reacciones codificadas por un gen común y / o por uno o más ortólogos de ese gen que exhiben un comportamiento similar o sustancialmente igual actividad. La reducción tanto del gen común como de todos los ortólogos puede conducir a la abolición completa de cualquier actividad catalítica de una reacción dirigida. Sin embargo, la interrupción del gen común o de uno o más ortólogos puede conducir a una reducción en la actividad catalítica de la reacción dirigida suficiente para promover el acoplamiento del crecimiento a la biosíntesis del producto. En este documento se ejemplifican los genes comunes que codifican actividades catalíticas para una variedad de modificaciones metabólicas, así como sus ortólogos. Los expertos en la materia comprenderán que la interrupción de algunos o todos los genes que codifican una enzima de una reacción metabólica dirigida puede llevarse a cabo en los métodos de la invención e incorporarse a los organismos microbianos de la invención que no se producen naturalmente para lograr un menor flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA. Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia también comprenderán que la actividad o expresión enzimática puede atenuarse utilizando métodos habituales. La reducción de la actividad o la cantidad de una enzima puede imitar la interrupción completa de un gen si la reducción hace que la actividad de la enzima caiga por debajo de un nivel crítico que normalmente se requiere para que una ruta funcione. La reducción de la actividad enzimática mediante diversas técnicas en lugar del uso de una modificación genética puede ser importante para la supervivencia de un organismo. Los métodos para reducir la actividad enzimática que resultan en efectos similares o idénticos de una modificación genética incluyen, entre otros: reducir la transcripción o traducción de genes; la desestabilización del ARNm, la proteína o el ARN catalítico; y mutar un gen que afecte a la actividad enzimática o la cinética (véase, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)). Los controles reglamentarios naturales o impuestos también pueden lograr la atenuación enzimática, que incluye: el reemplazo del promotor (Véase, Wang et al., *Mol. Biotechnol.* 52 (2): 300-308 (2012)); la pérdida o modificación de los factores de transcripción (Dietrick et al., *Annu. Rev. Biochem.* 79: 563-590 (2010); y Simicevic et al., *Mol. Biosist.* 6 (3): 462-468 (2010)); introducción de ARN inhibitorios o péptidos como ARNip, ARN antisentido, ARN o aptámeros de unión a péptidos / moléculas pequeñas, ribozimas, aptazimas y riboswitches (Wieland et al., *Methods* 56 (3): 351-357 (2012); O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (1): 44-48 (2002); y Lee et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (5): 505-511 (2003)); y la adición de medicamentos u otras sustancias químicas que reduzcan o interrumpan la actividad enzimática, como un inhibidor enzimático, un antibiótico o un medicamento específico para la diana. Todo experto en la materia también comprenderá y reconocerá que la atenuación de una enzima se puede realizar a varios niveles. Por ejemplo, a nivel genético, una mutación que cause un fenotipo nulo parcial o completo, como una modificación genética, o una mutación que cause efectos genéticos epistáticos que enmascaren la actividad del producto genético (Miko, *Nature Education* 1 (1) (2008))), pueden usarse para atenuar una enzima. En el nivel de expresión génica, los métodos para la atenuación incluyen: la transcripción de acoplamiento a un inductor endógeno o exógeno, como el isopropilto-galactósido (IPTG), luego agregando cantidades bajas de inductor o ningún inductor durante la fase de producción (Donovan et al., *J. Ind. Microbiol.* 16 (3): 145-154 (1996); y Hansen et al., *Curr. Microbiol.* 36 (6): 341-347 (1998)); introducir o modificar un regulador positivo o negativo de un gen; modificar la acetilación / desacetilación de histonas en una región cromosómica eucariota donde se integra un gen (Yang et al., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13 (2): 143-153 (2003) y Kurdistani et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (4): 276-284 (2003)); introducir una transposición para interrumpir un promotor o un gen regulador (Bleykasten-Broschans et al., *C. R. Biol.* 33 (8-9): 679-686 (2011); y McCue et al., *PLoS Genet.* 8 (2): e1002474 (2012)); invertir la orientación de un elemento transponible o región promotora para modular la expresión génica de un gen adyacente (Wang et al., *Genetics* 120 (4): 875-885 (1988); Hayes, *Annu. Rev. Genet.* 37: 3-29 (2003); en un organismo diploide, eliminar un alelo que resulte en pérdida de heterocigosidad (Daigaku et al., *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600 (1-2) 177-183 (2006)); introducir ácidos nucleicos que aumenten la degradación del ARN (Houseley et al., *Cell*, 136 (4): 763-776 (2009); o en bacterias, por ejemplo, la introducción de un marcador de ARN mensajero de transferencia (tmRNA), que puede conducir a la degradación de ARN y al estancamiento ribosómico (Sunohara et al., *RNA* 10 (3): 378-386 (2004); y Sunohara et al., *J. Biol. Chem.* 279:15368-15375 (2004)). En el nivel de la traducción, la atenuación puede incluir: introducir codones raros para limitar la traducción (Angov, *Biotechnol. J.* 6 (6): 650-659 (2011)); introducir moléculas de interferencia de ARN que bloqueen la traducción (Castel et al., *Nat. Rev. Genet.* 14 (2): 100-112 (2013); y Kawasaki et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7 (2): 125-131 (2005); modificar regiones fuera de la secuencia de codificación, como la introducción de una estructura secundaria en una región no traducida (UTR) para bloquear la traducción o reducir la eficiencia de la traducción (Ringnér et al., *PLoS Comput. Biol.* 1 (7): e72 (2005)); agregar sitios de ARNasa para una degradación rápida de la transcripción (Pasquinelli, *Nat. Rev. Genet.* 13 (4): 271-282 (2012); y Arraiano et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 34 (5): 883-932 (2010); introducción de oligómeros de ARN antisentido o transcripciones antisentido (Nashizawa et al., *Front. Biosci.* 17: 938-958 (2012)); introducir ARN o péptidos aptámeros, ribozimas, aptazimas, riboswitches (Wieland et al., *Methods* 56 (3): 351-357 (2012); O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (1): 44-48 (2002); y Lee et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (5): 505-511 (2003)); o introducir elementos reguladores de la traducción que involucren a una estructura de ARN que pueda prevenir o reducir la traducción que puede ser controlada por la presencia o ausencia de moléculas pequeñas (Araujo et al., *Comparative and Functional Genomics*, ID del artículo 475731, 8 páginas (2012)). A nivel de la localización enzimática y / o longevidad, la atenuación enzimática puede incluir: agregar un marcador de degradación para un recambio proteico más rápido (Hochstrasser, *Annual. Rev. Genet.* 30: 405-439 (1996); y Yuan et al., *PLoS One* 8 (4): e62529 (2013)); o agregar un marcador de la localización que dé como resultado que la enzima sea secretada o localizada en un



compartimento subcelular en una célula eucariota, en el que la enzima no podría reaccionar con su sustrato normal (Nakai et al. *Genomics* 14 (4): 897-911 (1992) y Russell et al., *J. Bact.* 189(21):7581-7585 (2007)). A nivel de la regulación postraduccional, la atenuación enzimática puede incluir: aumentar la concentración intracelular de inhibidores conocidos; o modificar sitios modificados postraducionales (Mann et al., *Nature Biotech.* 21:255-261 (2003)). A nivel de la actividad enzimática, la atenuación enzimática puede incluir: agregar un inhibidor endógeno o exógeno, como un inhibidor enzimático, un antibiótico o un fármaco específico para la diana, para reducir la actividad enzimática; limitar la disponibilidad de cofactores esenciales, como la vitamina B12, para una enzima que requiera el cofactor; quelar un ion metálico que se requiere para la actividad enzimática; o introducir una mutación negativa dominante. La capacidad de aplicación de una técnica de atenuación descrita anteriormente puede depender de si un organismo microbiano del huésped dado es procarionta o eucariota, y se entiende que todo experto en la técnica puede determinar fácilmente cuál será la técnica apropiada para un huésped determinado.

Se entiende que una modificación genética que aumente la expresión de una enzima deseada se lleva a cabo generalmente introduciendo en el organismo microbiano un ácido nucleico exógeno que codifique la enzima deseada. Sin embargo, dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que una modificación genética para aumentar la expresión también puede incluir modificaciones de una expresión génica o región reguladora de un gen endógeno. Dichas regiones incluyen, por ejemplo, un promotor, potenciador y / u otra región reguladora tal como una secuencia que altere la estabilidad o la vida media del ácido nucleico codificante. Por ejemplo, un promotor más fuerte y / o un potenciador pueden incluirse o sustituirse en el gen endógeno para lograr una mayor expresión usando métodos habituales en la técnica. A modo de ilustración, la invención se describirá con referencia al aumento de la expresión a través de la introducción de un ácido nucleico codificador exógeno. Sin embargo, tales enseñanzas son igualmente aplicables para aumentar la expresión al aumentar la fuerza de la expresión y los elementos reguladores. De manera similar, una modificación genética que atenúe la expresión puede relacionarse con modificaciones que alteren la actividad de una proteína codificada o pueden relacionarse con moléculas reguladoras a nivel transcripcional o proteico, como se describe en este documento.

Los organismos microbianos no naturales de la invención que tienen ácidos nucleicos exógenos que codifican una enzima o proteína descrita en el presente documento pueden producirse introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican una o más de las enzimas o proteínas que participan en una o más de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento. Las modificaciones genéticas ejemplares para introducir un ácido nucleico codificante incluyen, por ejemplo, la introducción de uno o más ácidos nucleicos exógenos que codifican una piridin-nucleótido transhidrogenasa, una enzima de la ruta para la biosíntesis de un compuesto bioderivado, NADH deshidrogenasa Ndh-I, citocromo bo oxidasa y / o fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Dependiendo del organismo microbiano huésped elegido para la biosíntesis de un compuesto bioderivado, se pueden expresar los ácidos nucleicos para una o más de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento relacionadas con la expresión de una codificación del ácido nucleico exógeno.

Los organismos microbianos del huésped pueden seleccionarse, por ejemplo, entre bacterias, levaduras, hongos o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables o adecuados para procesos de fermentación, y también los organismos microbianos que no se producen naturalmente se generan en los organismos mencionados anteriormente. Las bacterias ejemplares incluyen cualquier especie seleccionada del orden Enterobacteriales, familia Enterobacteriaceae, incluidos los géneros *Escherichia* y *Klebsiella*; el orden Aeromonadales, familia Succinivibrionaceae, incluido el género *Anaerobiospirillum*; el orden Pasteurellales, familia Pasteurellaceae, incluidos los géneros *Actinobacillus* y *Mannheimia*; el orden Rhizobiales, familia Bradyrhizobiaceae, incluido el género *Rhizobium*; el orden Bacillales, familia Bacillaceae, incluido el género *Bacillus*; el orden Actinomycetales, familias Corynebacteriaceae y Streptomycetaceae, incluidos el género *Corynebacterium* y el género *Streptomyces*, respectivamente; orden Rhodospirillales, familia Acetobacteraceae, incluido el género *Gluconobacter*, orden Sphingomonadales, familia Sphingomonadaceae, incluido el género *Zymomonas*; el orden Lactobacillales, familias Lactobacillaceae y Streptococcaceae, incluidos el género *Lactobacillus* y el género *Lactococcus*, respectivamente; el orden Clostridiales, familia Clostridiaceae, género *Clostridium*; y el orden Pseudomonadales, familia Pseudomonadaceae, incluido el género *Pseudomonas*. Las especies no limitantes de bacterias huésped incluyen *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Pseudomonas putida*.

De manera similar, las especies ejemplares de levadura u hongos incluyen cualquier especie seleccionada del orden Saccharomycetales, familia Saccharomycetaceae, incluidos los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Pichia*; el orden Saccharomycetales, familia Dipodascaceae, incluido el género *Yarrowia*; el orden Schizosaccharomycetales, familia Schizosaccharomycetaceae, incluido el género *Schizosaccharomyces*; el orden Eurotiales, familia Trichocomaceae, incluido el género *Aspergillus*; y el orden Mucorales, familia Mucoraceae, incluido el género *Rhizopus*. Las especies no limitantes de levadura u hongos hospedantes incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, etc. *E. coli* es un organismo huésped particularmente útil ya que es un organismo microbiano bien caracterizado adecuado para la ingeniería genética. Otros organismos hospedantes particularmente útiles incluyen levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*. Se

entiende que cualquier organismo huésped microbiano adecuado puede usarse para introducir modificaciones metabólicas y / o genéticas para producir un producto deseado.

Del mismo modo, los expertos en la materia entienden que un organismo huésped puede seleccionarse en función de las características deseadas para la introducción de una o más atenuaciones para reducir el flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA o debilitar, reducir o disminuir la actividad de otras enzimas o proteínas de la invención. Por lo tanto, se entiende que, si se va a introducir una modificación genética en un organismo huésped para modificar un gen, cualquier homólogo, ortólogo o parólogo que catalice reacciones metabólicas similares, pero no idénticas, se pueden interrumpir de manera similar para garantizar que una reacción metabólica deseada sea suficientemente interrumpida. Debido a que existen ciertas diferencias entre las redes metabólicas entre los diferentes organismos, los expertos en la materia entenderán que los genes reales modificados en un organismo dado pueden diferir entre los organismos. Sin embargo, dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia también comprenderán que los métodos de la invención se pueden aplicar a cualquier microorganismo huésped adecuado para identificar las modificaciones metabólicas relacionadas necesarias para construir un organismo en una especie de interés que reducirá el flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA.

Las fuentes de codificación de ácidos nucleicos para una enzima o proteína descrita en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie en la que el producto génico codificado sea capaz de catalizar la reacción referida. Dichas especies incluyen organismos procariotas y eucariotas que incluyen, entre otros, bacterias, que incluyen arqueas y eubacterias, y eucariotas, que incluyen levaduras, plantas, insectos, animales y mamíferos, incluidos los seres humanos. Son especies ejemplares de dichas fuentes, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Megathyrus maximus*, *Haemophilus influenza*, *Methylobacterium extorquens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Acidaminococcus fermentans*, *Clostridium symbiosum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium kluyveri*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei*, *Clostridium aminobutyricum*, *Porphyromonas gingivalis* W83, *Acetobacter acetii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Citrobacter youngae*, *Salmonella enteric*, *Yersinia intermedia*, *Oxalobacter formigenes*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp. ADP1, *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas knackmussii*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Sus scrofa*, *Roseburia* sp. A2-183, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinivorans*, *Eubacterium rectale*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium novyi* NT, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium botulinum*, *Haloarcula marismortui*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2, *Rhizobium leguminosarum*, así como otras especies ejemplares descritas en este documento o disponibles como organismos fuente para los genes correspondientes. Sin embargo, con la secuencia completa del genoma disponible para más de 550 especies (con más de la mitad de estas disponibles en bases de datos públicas como el NCBI), incluidos 395 genomas de microorganismos y una variedad de genomas de levaduras, hongos, plantas y mamíferos, la identificación de genes que codifican la actividad requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, incluidos, por ejemplo, desplazamientos de genes homólogos, ortólogos, parálogos y no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de modificaciones genéticas entre organismos es rutinario y habitual en la técnica. En consecuencia, las modificaciones metabólicas que permiten un menor flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA descrito en este documento con referencia a un organismo particular como *E. coli* se pueden aplicar fácilmente a otros microorganismos, incluidos los organismos procariotas y eucariotas por igual. Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia sabrán que una modificación metabólica ejemplificada en un organismo puede aplicarse igualmente a otros organismos.

En algunos casos, como cuando existe una enzima o proteína metabólica alternativa en especies no descritas explícitamente en este documento, la actividad deseada se puede conferir a la especie huésped, por ejemplo, mediante la expresión exógena de un parólogo o varios a partir de una o más especies que catalizan una reacción metabólica similar, pero no idéntica, para reemplazar la reacción referida. Debido a que existen ciertas diferencias entre las reacciones metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la materia entenderán que el uso real de genes entre diferentes organismos puede diferir. Sin embargo, dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia también comprenderán que las enseñanzas y los métodos de la invención se pueden aplicar a todos los organismos microbianos utilizando las modificaciones genéticas afines a las ejemplificadas en el presente documento para construir un organismo microbiano en una especie de interés que exhibirá la actividad metabólica deseada.

Una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima o proteína descrita en el presente documento también puede incluir una molécula de ácido nucleico que se hibride con un ácido nucleico descrito en el presente documento por SEQ ID NO, GenBank y / o número GI o una molécula de ácido nucleico que se hibride con una molécula de ácido nucleico que codifique una secuencia de aminoácidos descrita en este documento por SEQ ID NO, GenBank y / o número GI. Las condiciones de hibridación pueden incluir condiciones de hibridación altamente rigurosas, moderadamente rigurosas o de baja rigurosidad que los expertos en la materia conocen bien, como las descritas en el presente documento. De manera similar, una molécula de ácido nucleico que se puede usar en la invención puede describirse como que tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia con un ácido nucleico descrito en el presente documento por SEQ ID NO, GenBank y / o número GI o una molécula de ácido nucleico que se hibride con una molécula de ácido nucleico que codifique una secuencia de aminoácidos descrita en este

documento por SEQ ID NO, GenBank y / o número GI. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede tener al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un ácido nucleico descrito en este documento.

5 La hibridación rigurosa se refiere a condiciones bajo las cuales los polinucleótidos hibridados son estables. Como saben los expertos en la materia, la estabilidad de los polinucleótidos hibridados se refleja en la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de los híbridos. En general, la estabilidad de los polinucleótidos hibridados es una función de la concentración de sal, por ejemplo, la concentración de iones de sodio y la temperatura. Se puede realizar una reacción de hibridación en condiciones de rigurosidad más baja, seguida de lavados de rigurosidad variable pero más alta. La referencia a la rigurosidad de la hibridación se refiere a tales condiciones de lavado. La hibridación  
10 altamente estricta incluye condiciones que permitan la hibridación de solo aquellas secuencias de ácido nucleico que formen polinucleótidos hibridados estables en NaCl 0,018M a 65°C, por ejemplo, si un híbrido no es estable en NaCl 0,018M a 65°C, no será estable en condiciones de alta rigurosidad, como se contempla en el presente documento. Se pueden proporcionar condiciones de alta rigurosidad, por ejemplo, por hibridación en formamida al 50%, solución de Denhart 5X, SSPE 5X, SDS al 0,2% a 42°C, seguido de lavado en SSPE 0,1X y SDS al 0,1% a 65°C. Las  
15 condiciones de hibridación distintas de las condiciones de hibridación altamente estrictas también se pueden usar para describir las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento. Por ejemplo, la frase hibridación moderadamente estricta se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en formamida al 50%, solución de Denhart 5X, SSPE 5X, SDS al 0,2% a 42°C, seguido de lavado en SSPE 0,2X, SDS al 0,2%, a 42°C. La frase hibridación de baja rigurosidad se refiere a condiciones equivalentes a la hibridación en formamida al 10%, solución de Denhart 5X, SSPE 6X, SDS al 0,2% a 22°C, seguido de lavado en SSPE 1X, SDS al 0,2% a 37°C. La solución de Denhart contiene 1% de Ficoll, 1% de polivinilpirrolidona y 1% de albúmina de suero bovino (BSA). 20X SSPE (cloruro de sodio, fosfato de sodio, ácido etilendiamida tetraacético (EDTA)) contiene cloruro de sodio 3M, fosfato de sodio 0,2M y 0,025 M (EDTA). Otros tampones y condiciones de hibridación de rigurosidad baja, moderada y alta adecuados son habituales para los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al.,  
25 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

Una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima o proteína descrita en el presente documento puede tener al menos una cierta identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos descrita en el presente documento. Por consiguiente, en algunos aspectos de la invención, una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima o  
30 proteína descrita en el presente documento tiene una secuencia de nucleótidos de al menos 65% de identidad, al menos 70% de identidad, al menos 75% de identidad, al menos 80% de identidad, al menos 85% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 91% de identidad, al menos 92% de identidad, al menos 93% de identidad, al menos 94% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 96% de identidad, al menos 97% de identidad, al menos 98% de identidad, o al menos 99% de identidad, o es simplemente idéntica a un ácido nucleico descrito en este documento por SEQ ID NO, GenBank y / o número GI o una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos descrita en este documento por SEQ ID NO, GenBank y / o número GI.  
35

La identidad de secuencia (también conocida como homología o similitud) se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico o entre dos polipéptidos. La identidad se puede determinar comparando una  
40 posición en cada secuencia, que se puede alinear con fines comparativos. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de identidad entre las secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. La alineación de dos secuencias para determinar su porcentaje de identidad de secuencia se puede hacer utilizando programas de software conocidos en la técnica, como, por ejemplo, los descritos en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999). Preferiblemente, se utilizan para la alineación los parámetros predeterminados. Un programa de alineación habitual en la técnica que se puede usar es el BLAST configurado con los parámetros predeterminados. En particular, los programas son BLASTN y BLASTP, utilizando los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; valor esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = HIGH SCORE; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + Traducciones de GenBank CDS + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en el Centro Nacional de Información Biotecnológica.  
45

Los métodos para construir y probar los niveles de expresión de huéspedes no naturales que tienen un menor flujo de carbono de succinil-CoA a succinato a través de un ciclo oxidativo de TCA pueden realizarse, por ejemplo, mediante métodos recombinantes y de detección habituales en la técnica. Tales métodos se pueden encontrar descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).  
55

Las secuencias de ácido nucleico exógeno pueden introducirse de manera estable o transitoria en una célula huésped usando técnicas habituales en la técnica que incluyen, entre otras, la conjugación, electroporación, transformación química, transducción, transfección y transformación por ultrasonidos. Para la expresión exógena en E. coli u otras células procariontas, algunas secuencias de ácido nucleico en los genes o ADNc de ácidos nucleicos  
60

5 eucariotas pueden codificar señales de direccionamiento como una señal mitocondrial N-terminal u otra señal de  
direccionamiento, que puede eliminarse antes de la transformación en células huésped procarióticas, si se desea.  
Por ejemplo, la eliminación de una secuencia líder mitocondrial condujo a una mayor expresión en *E. coli*  
(Hoffmeister et al., *J. Biol. Chem* 280:4329-4338 (2005)). Para la expresión exógena en levaduras u otras células  
10 eucariotas, los genes pueden expresarse en el citosol sin la adición de la secuencia líder, o pueden dirigirse a la  
mitocondria u otros orgánulos, o dirigirse a la secreción, mediante la adición de una secuencia de direccionamiento  
adecuada, como un objetivo mitocondrial o señal de secreción adecuada para las células huésped. Por lo tanto, se  
entiende que las modificaciones apropiadas en una secuencia de ácido nucleico para eliminar o incluir una  
15 secuencia dirigida pueden incorporarse en una secuencia de ácido nucleico exógeno para impartir propiedades  
deseables. Además, los genes pueden someterse a la optimización de codones con técnicas habituales en la técnica  
para lograr una expresión optimizada de las proteínas.

Se puede construir un vector o vectores de expresión para incluir una o más proteínas o enzimas que codifican  
ácidos nucleicos como se ejemplifica en el presente documento unidos operativamente a secuencias de control de la  
15 expresión funcionales en el organismo huésped. Los vectores de expresión aplicables para su uso en los  
organismos huésped microbianos de la invención incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores fagos, vectores virales,  
episomas y cromosomas artificiales, incluidos vectores y secuencias de selección o marcadores operables para una  
integración estable en un cromosoma huésped. Además, los vectores de expresión pueden incluir uno o más genes  
20 marcadores seleccionables y secuencias de control de la expresión apropiadas. También se pueden incluir genes  
marcadores seleccionables que, por ejemplo, proporcionan resistencia frente a antibióticos o toxinas, complementan  
deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos que no están en los medios de cultivo. Las secuencias de  
control de la expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de la transcripción,  
terminadores de la transcripción, etc., que son habituales en la técnica. Cuando se tienen que expresar  
25 conjuntamente dos o más ácidos nucleicos codificadores exógenos, ambos ácidos nucleicos se pueden insertar, por  
ejemplo, en un único vector de expresión o en vectores de expresión separados. Para la expresión de un solo  
vector, los ácidos nucleicos codificadores se pueden unir operativamente a una secuencia de control de la expresión  
común o a diferentes secuencias de control de la expresión, como un promotor inducible y un promotor constitutivo.  
La transformación de secuencias de ácido nucleico exógenas involucradas en una ruta metabólica o sintética puede  
30 confirmarse usando métodos habituales en la técnica. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, análisis de ácidos  
nucleicos, tales como las transferencias Northern o la amplificación del ARNm por la reacción en cadena de la  
polimerasa (PCR), o inmunotransferencias para la expresión de productos génicos, u otros métodos analíticos  
adecuados para probar la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida o su producto genético  
correspondiente. Los expertos en la materia entienden que el ácido nucleico exógeno se expresa en una cantidad  
35 suficiente para producir el producto deseado, y se entiende además que los niveles de expresión pueden  
optimizarse para obtener una expresión suficiente usando métodos habituales en la técnica y como son descritos en  
este documento.

Las cepas manipuladas pueden caracterizarse midiendo la tasa de crecimiento, la tasa de absorción del sustrato y /  
o la tasa de secreción del producto / subproducto. Los cultivos se pueden cultivar y usar como inóculos para un  
nuevo cultivo por lotes para el que se toman mediciones durante el crecimiento exponencial. La tasa de crecimiento  
40 se puede determinar midiendo la densidad óptica con el uso de un espectrofotómetro (A600). Las concentraciones  
de glucosa y otros subproductos de ácidos orgánicos en el sobrenadante de cultivo se pueden determinar mediante  
métodos habituales como HPLC, GC-MS u otros métodos analíticos habituales adecuados para el análisis del  
producto deseado, como se describe en este documento, y se utilizan para calcular la absorción y las tasas de  
secreción.

La invención proporciona un método para producir un compuesto bioderivado. El método incluye cultivar un  
45 organismo microbiano no natural que tiene una o más modificaciones metabólicas descritas en el presente  
documento y una ruta metabólicamente diseñada para producir un compuesto bioderivado. Las modificaciones  
metabólicas incluyen atenuaciones y / o modificaciones genéticas tales como la expresión de un ácido nucleico  
codificador exógeno como se describe en este documento. La ruta de ingeniería metabólica puede utilizar un  
sustrato intermedio del ciclo TCA o un sustrato del ciclo TCA para la producción de compuestos bioderivados o  
50 utilizar un sustrato derivado de una ruta metabólica del ciclo no TCA.

En una realización, la invención proporciona un método para producir un compuesto bioderivado. El método incluye  
el cultivo de un organismo microbiano no natural que tiene una primera atenuación de una succinil-CoA sintetasa y  
al menos una segunda atenuación de una enzima convertidora de succinil-CoA o un gen que codifica una enzima  
productora de succinato dentro de una ruta de múltiples pasos que tiene una conversión neta de succinil-CoA a  
55 succinato y que tiene una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un  
intermedio del ciclo de TCA o sustrato del ciclo TCA durante un período de tiempo suficiente en condiciones  
suficientes para producir dicho compuesto bioderivado. El organismo microbiano de origen no natural puede incluir  
adicionalmente una o más modificaciones metabólicas, que incluyen hasta todas las modificaciones metabólicas  
descritas en este documento.

60 Además, la invención proporciona un método para disminuir la conversión de succinil-CoA a succinato en un  
organismo microbiano no natural, disminuyendo la producción del exceso de CO<sub>2</sub> en un organismo microbiano no  
natural, disminuyendo el flujo a través de un ciclo oxidativo de TCA en un organismo microbiano natural,

disminuyendo la utilización de oxígeno por organismo microbiano no natural y / o aumentando la disponibilidad de ATP en un organismo microbiano no natural. El método incluye cultivar un organismo microbiano no natural que tiene una o más modificaciones metabólicas como se describe en el presente documento. El organismo microbiano de origen no natural puede usarse como referencia o control para la generación de un organismo que tenga una ruta metabólicamente diseñada para la producción de un compuesto bioderivado, por ejemplo.

La purificación y / o ensayos adecuados para analizar una o varias modificaciones genéticas descritas en el presente documento pueden realizarse usando métodos habituales. Se pueden cultivar réplicas adecuadas, como cultivos por triplicado, para cada cepa modificada que se vaya a analizar. Por ejemplo, se puede controlar la formación de productos metabólicos y subproductos de las reacciones de ingeniería en el huésped. Por ejemplo, el producto y / o cualquier producto intermedio puede analizarse por métodos tales como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), GC-MS (cromatografía de gases-espectroscopía de masas) y LC-MS (cromatografía líquida-espectroscopía de masas) u otros métodos de análisis adecuados que usen procedimientos de rutina habituales en la técnica. La liberación de un producto metabólico diseñado en el caldo de fermentación también se puede probar con el sobrenadante de cultivo. Los subproductos y la glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC usando, por ejemplo, un detector del índice de refracción para la glucosa y los alcoholes, y un detector de UV para ácidos orgánicos (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng* 90: 775-779 (2005)), u otros métodos adecuados de ensayo y detección habituales en la técnica. Las actividades individuales de enzimas o proteínas de las secuencias de ácido nucleico exógenas también se pueden analizar usando métodos habituales en la técnica. Tales métodos se ejemplifican en los ejemplos a continuación. También se pueden emplear otros métodos habituales en la técnica para analizar la producción de una o más actividades metabólicas descritas en el presente documento.

Los productos de cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, un compuesto bioderivado, se pueden separar de otros componentes en el cultivo usando una variedad de métodos habituales en la técnica. Tales métodos de separación incluyen, por ejemplo, procedimientos de extracción, así como métodos que incluyen la extracción continua de líquido-líquido, pervaporación, filtración por membrana, separación por membrana, ósmosis inversa, electrodialisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de adsorción y ultrafiltración. Todos los métodos anteriores son habituales en la técnica.

Cualquiera de los organismos microbianos de origen no natural descritos en el presente documento puede cultivarse para producir y / o secretar, por ejemplo, un compuesto bioderivado de la invención. Por ejemplo, un organismo microbiano huésped que produzca un compuesto bioderivado de la invención puede cultivarse para la producción biosintética de dicho compuesto. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la invención proporciona un medio de cultivo que tiene un compuesto bioderivado descrito en este documento. En algunos aspectos, el medio de cultivo también puede separarse de los organismos microbianos no naturales de la invención que produjeron el compuesto bioderivado. Los métodos para separar un organismo microbiano del medio de cultivo son habituales en la técnica. Los métodos ejemplares incluyen filtración, floculación, precipitación, centrifugación, sedimentación y similares.

Para la producción de un compuesto bioderivado, las cepas recombinantes se cultivan en un medio con una fuente de carbono y otros nutrientes esenciales. A veces es deseable y puede ser altamente deseable mantener condiciones anaeróbicas en el fermentador para reducir el coste del proceso general. Tales condiciones pueden obtenerse, por ejemplo, primero purgando al medio con nitrógeno y luego sellando los matraces con un tabique y una tapa de engarce. Para las cepas en las que no se observa ningún crecimiento anaeróbico, se pueden aplicar condiciones microaerobias o sustancialmente anaerobias perforando el tabique con un pequeño orificio para una aireación limitada. Las condiciones anaeróbicas ejemplares se han descrito previamente y son habituales en la técnica. Se describen condiciones aeróbicas y anaeróbicas ejemplares, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007. Las fermentaciones se pueden realizar de forma discontinua, discontinua o continua, como se describe en este documento. Las fermentaciones también se pueden realizar en dos fases, si se desea. La primera fase puede ser aeróbica para permitir un alto crecimiento y, por lo tanto, una alta productividad, seguida de una fase anaeróbica de altos rendimientos de compuestos bioderivados.

Si se desea, el pH del medio puede mantenerse a un pH deseado, en particular un pH neutro, tal como un pH de alrededor de 7 mediante la adición de una base, como NaOH u otras bases, o ácido, según sea necesario para mantener el medio del cultivo a un pH deseable. La tasa de crecimiento se puede determinar midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa de absorción de glucosa monitoreando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo.

El medio de crecimiento puede incluir, por ejemplo, cualquier fuente de carbohidratos que pueda suministrar una fuente de carbono al microorganismo no natural. Dichas fuentes incluyen, por ejemplo: azúcares, tales como la glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa, sacarosa y almidón; o glicerol, y se entiende que una fuente de carbono puede usarse sola como la única fuente de carbono o en combinación con otras fuentes de carbono descritas en este documento o conocidas en la técnica. Otras fuentes de carbohidratos incluyen, por ejemplo, materias primas renovables y biomasa. Los ejemplos de tipos de biomasa que pueden usarse como materias primas en los métodos de la invención incluyen biomasa celulósica, biomasa hemicelulósica y materias primas de lignina o porciones de materias primas. Dichas materias primas de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de carbohidratos útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y

almidón. Dadas las enseñanzas y el sentido proporcionados en el presente documento, los expertos en la materia comprenderán que materias primas renovables y biomásas distintas de las ejemplificadas anteriormente también pueden usarse para cultivar los organismos microbianos de la invención con el fin de disminuir la conversión de succinil-CoA en succinato, disminuyendo la producción del exceso de CO<sub>2</sub>, disminuyendo el flujo a través de un ciclo oxidativo de TCA, disminuyendo la utilización de oxígeno por organismo microbiano o aumentando la disponibilidad del ATP.

Las condiciones de cultivo pueden incluir, por ejemplo, procedimientos de cultivo líquido, así como fermentaciones y otros procedimientos de cultivo a gran escala. Como se describe en el presente documento, se pueden obtener rendimientos particularmente útiles de los productos biosintéticos de la invención en condiciones de cultivo anaeróbicas o sustancialmente anaeróbicas.

Como se describe en este documento, una condición de crecimiento ejemplar para lograr una conversión decreciente de succinil-CoA en succinato, disminuir la producción de CO<sub>2</sub> en exceso, disminuir el flujo a través de un ciclo oxidativo de TCA, disminuir la utilización de oxígeno por organismo microbiano o aumentar la disponibilidad de ATP incluye el cultivo anaerobio o condiciones de fermentación. En ciertas realizaciones, los organismos microbianos no naturales de la invención pueden mantenerse, cultivarse o fermentarse en condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias. Brevemente, una condición anaeróbica se refiere a un ambiente desprovisto de oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaeróbicas incluyen, por ejemplo, un cultivo, fermentación discontinua o fermentación continua de modo que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanezca entre 0 y 10% de saturación. Las condiciones sustancialmente anaeróbicas también incluyen células en crecimiento o en reposo en medio líquido o en agar sólido dentro de una cámara sellada mantenida con una atmósfera de menos del 1% de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede mantenerse, por ejemplo, purgando el cultivo con una mezcla de N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> u otro gas o gases adecuados sin oxígeno.

Las condiciones de cultivo descritas en el presente documento se pueden ampliar y cultivar continuamente para la fabricación de un producto deseado. Los procedimientos de crecimiento ejemplares incluyen, por ejemplo, fermentación en lotes alimentados y separación en lotes; fermentación por lotes alimentados y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procesos son habituales en la técnica. Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción biosintética de cantidades comerciales de un producto deseado. Generalmente, y al igual que con los procedimientos de cultivo no continuos, la producción continua y / o casi continua de un producto deseado incluirá el cultivo de un organismo microbiano no natural de la invención en suficientes nutrientes y medio para mantener y / o casi mantener el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo en tales condiciones puede incluir, por ejemplo, el crecimiento o el cultivo durante 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o más. Además, el cultivo continuo puede incluir períodos de tiempo más largos de 1 semana, 2, 3, 4 o 5 semanas o más y hasta varios meses. Alternativamente, los organismos de la invención pueden cultivarse durante horas, si son adecuados para una aplicación particular. Debe entenderse que las condiciones de cultivo continuas y / o casi continuas también pueden incluir todos los intervalos de tiempo entre estos períodos ejemplares. Se entiende además que el tiempo de cultivo del organismo microbiano de la invención es durante un período de tiempo suficiente para producir una cantidad suficiente de producto para un propósito deseado.

Los procedimientos de fermentación son habituales en la técnica. Brevemente, la fermentación para la producción biosintética de un compuesto bioderivado puede utilizarse, por ejemplo, en fermentación por lotes alimentados y separación en lotes; fermentación por lotes alimentados y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Los ejemplos de procedimientos de fermentación continua y discontinua son habituales en la técnica.

Se entiende que las modificaciones que no afecten sustancialmente a la actividad de las diversas realizaciones de esta invención también se proporcionan dentro de la definición de la invención proporcionada en este documento. Por consiguiente, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la presente invención.

#### Ejemplo I

##### Supresión de YciA, YbfF, YdiI

Este ejemplo describe la eliminación de tres CoA hidrolasas endógenas en la cepa huésped 6286 y el efecto sobre la producción de succinato en la cepa huésped 6286.

Condiciones de cultivo para placas de 96 pocillos. Todos los cultivos en placas de 96 pocillos se cultivaron en 1,2 ml de medio M9 (6,78 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,0 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l de NaCl, 1,0 g/l de NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM de CaCl<sub>2</sub>) suplementado con NaHCO<sub>3</sub> 10 mM y MOPS 100 mM para mejorar la capacidad tamponante. También se añadió una fuente de carbono en forma de glucosa al 5%. Las condiciones microaerobias se obtuvieron cubriendo las placas con dos sellos adhesivos permeables a los gases. Los bordes del sello se sellaron para minimizar la evaporación. Todos los cultivos se cultivaron a 37°C. Los métodos analíticos para cuantificar biomasa, BDO, 4HB y succinato se han publicado en el documento US20140030779 y en Yim et al., Nature Chemical Biology 7: 445-452 (2011).

Para probar el impacto de las CoA hidrolasas endógenas en la conversión de succinil-CoA a succinato, se eliminaron *yciA*, *ybfF* e *ydil* en la cepa huésped 6286. La cepa 6619 se derivó de la cepa 6286 con el *yciA* eliminado. La cepa 6620 se obtuvo de la cepa 6286 con el *ydil* eliminado. La cepa 6618 se deriva de la cepa 6286 con *ybfF* eliminado.

5 La cepa 6286 se deriva de la cepa 6025, con la delección adicional de succinato deshidrogenasa (*sdhA*). La cepa 6025 se obtuvo de la cepa ECKh-432 cuya construcción se describe en los documentos US20110045575, US20140030779 y Yim et al., *Nature Chemical Biology* 7: 445-452 (2011). Las modificaciones notables en la cepa base ECKh-432 incluyen delecciones en *adhE*, *ldhA*, *pflB* y *mdh*. La cepa 6025 también contiene copias cromosómicamente integradas de genes que convierten succinil-CoA en BDO. Estos genes incluyen una succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxiacetato deshidrogenasa, una 4-hidroxiacetil-CoA reductasa (ALD), una 4-hidroxiacetilaldehído reductasa (ADH) y una 4-hidroxiacetil-CoA transferasa. La cepa 6025 también contiene delecciones en cuatro genes nativos de alcohol deshidrogenasa *adhP*, *yqhD*, *yahK* e *yjgB*. Esta cepa también tiene delecciones de citocromo oxidasas, *cyoABCD* y *appBC*, succinil-CoA sintetasa (*sucCD*), la derivación de glucoxilato (*aceBAK*), un sitio de integración de profagos (*ycil*) y genes de biosíntesis flagelar (*flhCD*, *motA*), el transportador predicho (*yebQ*), acil-CoA hidrolasas (*ybgC*, *tesB*, *ybhC*), aspartato-amoniaco liasa (*aspA*), ferricromo / fago / transportador proteico de antibiótico de la membrana externa (*fhuA*), glutamato sintasa (*gltBD*), una treonina aldolasa de baja especificidad (*ItaE*), PEP carboxiquinasa (*pckA*), el componente del sistema de escisión de glicina (*gcvT*), la proteína de la membrana externa de maltosa / proteína del receptor fago lambda (*lamB*) y los genes de las fimbrias (*fimABCDEFGHI*). Además, el promotor nativo de *ppc* fue reemplazado por un promotor constitutivo más fuerte. La cepa 6025 también contiene un gen *arcA* inactivado (Silverman et al., *J. Bacteriol.* 173(18):5648-5652 (1991)). Varios genes nativos están sobreexpresados cromosómicamente: *ackA*, *pta*, *sucA*, *sucB* y *lpdA*.

Las delecciones de *yciA*, *ydil* y *ybfF* se lograron utilizando un método de recombinación homóloga de doble cruce en dos pasos como se describió anteriormente (Yim et al, *Nature Chem Biol* 7: 445-52 (2011); documento US20140030779). La recombinación se catalizó mediante la expresión de los genes Lambda fago Red de pRED-Amp (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania). Los genes que codifican levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis* y la resistencia a la kanamicina se integraron en el cromosoma. La Kanamicina se usó para seleccionar integrantes exitosos. En un segundo paso de recombinación homóloga de doble cruce, la secuencia integrada que contenía el gen de levansucrasa y el gen de resistencia a la kanamicina se reemplazó con una secuencia de ADN apropiada (delección o inserción o mutación) y se seleccionaron los clones resistentes a sacarosa para determinar la sensibilidad frente a la kanamicina. Las secuencias de ADN utilizadas en los pasos de recombinación homóloga descritos anteriormente se construyeron mediante técnicas estándar de biología molecular. Tras la recombinación, la región cromosómica que abarcaba la modificación fue amplificada por PCR y secuenciada con el fin de verificar que la modificación esperada ocurriera según lo planeado. Las regiones flanqueantes (entre 500-1000 nt) que cubren cualquier secuencia reguladora fueron, por lo tanto, verificadas.

Los siguientes cebadores se usaron para confirmar las delecciones *yciA*, *ydil* y *ybfF*:

Denominación del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO
<i>yciA</i> F1	AGCCAGGCAGTGGGATTGTG	1
<i>yciA</i> R1	GGCAAACATCTACATCGCATTC	2
40 <i>ydil</i> F1	CGAATGAATGGCTGGCAAG	3
<i>ydil</i> R1	CCAGACGCCAGGCAAAGTAG	4
<i>ybfF</i> F1	TAAACGATGCCCTGACTACGC	5
<i>ybfF</i> R1	CGGATAGCGTCAAGCCTGG	6

45 Como consecuencia, se eliminaron los siguientes nucleótidos: 1.309.961-1.310.181 (*yciA*), 711.267-712.043 (*ybfF*) y 1.763.374-1.763.651 (*ydil*).

La cepa 6286 tiene varias modificaciones genéticas que interrumpen o alteran el ciclo de TCA. La inactivación de *arcA* permite un mayor flujo a través del ciclo oxidativo de TCA. La interrupción del regulador *ArcA* también aumenta el nivel de expresión de las citocromo oxidasas (tanto *cyo* como *cyd*) en relación con una cepa de tipo salvaje *ArcA*. La *sucCD* (succinil-CoA sintetasa) interrumpida reduce el flujo del ciclo TCA de succinil-CoA a succinato. El ciclo de TCA se interrumpió aún más por la eliminación de succinato deshidrogenasa, que convierte el succinato en fumarato. La Tabla 19 muestra la producción de BDO y los subproductos en placas de 96 pocillos de la cepa 6286 con y sin *yciA*. La actividad endógena de succinil-CoA en succinato da como resultado la acumulación de succinato en esta cepa. La eliminación de *yciA* en la cepa 6286 dio como resultado una menor producción de succinato, lo que

indica una actividad reducida de succinil-CoA en succinato. Además, se observaron mayores niveles de BDO y 4HB en células con yciA eliminado, lo que respalda el aumento del flujo hacia la ruta BDO en esta cepa.

Tabla 19. Producción de BDO en la cepa 6286 con y sin delección de yciA, ybfF e ydil. Se muestran cuatro cultivos replicados. Todas las concentraciones estaban en mM y se midieron después de 24 horas de tiempo de cultivo en placas de 96 pocillos.

5

Cepa	Modificación	OD	BDO	4HB	Succ	BDO/Succ
6286		3,58	71,0	8,9	19,0	3,7
6286		3,57	74,6	9,7	18,8	4,0
6286		3,6	77,4	8,9	18,7	4,1
6286		3,42	70,8	9,9	19,0	3,7
6619	Supresión de YciA	3,59	86,4	15,1	6,4	13,4
6619	Supresión de YciA	3,43	82,0	14,2	6,5	12,5
6619	Supresión de YciA	3,66	90,1	14,9	6,9	13,0
6619	Supresión de YciA	3,77	88,9	15,4	6,7	13,2
6618	Supresión de YciF	4,05	59,4	7,7	38,4	1,4
6618	Supresión de YciF	3,89	64,4	8,9	34,4	1,9
6618	Supresión de YciF	3,87	52,4	8,5	40,6	1,3
6618	Supresión de YciF	3,72	58,3	7,9	39,0	1,5
6620	Supresión de Ydil	3,86	73,4	10,3	23,4	3,1
6620	Supresión de Ydil	3,52	89,2	10,6	24,1	3,7
6620	Supresión de Ydil	4,04	77,9	10,5	25,2	3,1
6620	Supresión de Ydil	3,49	81,7	9,2	24,9	3,3

### Ejemplo II

#### Reducción del exceso de CO<sub>2</sub> por eliminación de YciA

10 Este ejemplo describe el análisis de flujo 13C en la fase de crecimiento de cepas con y sin yciA, demostrando que la eliminación de yciA en una cepa con sucCD interrumpido da como resultado una reducción del flujo de succinil-CoA en succinato y una reducción del exceso de CO<sub>2</sub>. El ejemplo también muestra que modificar la eficiencia energética de la cadena respiratoria puede mejorar la tasa de crecimiento de las cepas eliminadas de YciA.

15 Los métodos experimentales y computacionales de análisis de flujo de 13C en fase de crecimiento son conocidos en la técnica y se describen en Yang, T.H., "13C-Based Metabolic Flux Analysis: Fundamentals and Practice", en Systems Metabolic Engineering: Methods and Protocols, 297-334 (Alper, H.S. ed. , 2013). En resumen, los cultivos se cultivaron en matraces de agitación en medio mínimo M9 suplementado con <sup>13</sup>C-glucosa uniformemente marcada. Los cultivos se muestrearon en un crecimiento exponencial de la mitad de la fase logarítmica. Los productos metabólicos (constituyentes de biomasa y productos metabólicos secretados) se aislaron y cuantificaron por espectrometría de masas. A partir de las mediciones de concentración, se calcularon los coeficientes de rendimiento acumulativos para todas las especies extracelulares producidas y consumidas por las células, incluidas la biomasa y el CO<sub>2</sub>. Los patrones de marcado con 13C de los productos metabólicos se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) como se describió anteriormente (Fischer y Sauer, Eur. J. Biochem. 270:880-891 (2003)). Usando una red de reacción que comprende reacciones metabólicas centrales y productoras de BDO, se realizó una optimización numérica para estimar los flujos in vivo a partir de las  
20  
25 concentraciones de metabolitos obtenidas experimentalmente y los patrones de marcado de 13C.

El análisis de flujo 13C en fase de crecimiento se realizó para evaluar el impacto de yciA en las rutas metabólicas centrales. Las cepas utilizadas en este ejemplo son 6025 (yciA+), 6616 (6025 ΔyciA) y 6729 (6025 + cyoABCD



$\Delta yciA$ ). La distribución del flujo (por glucosa) entre las rutas metabólicas centrales para las cepas 6025, 6616 y 6729 se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. La distribución de flujo (por glucosa) entre las rutas metabólicas centrales para las cepas 6025, 6616 y 6729.

Cepa	Consumo de glucosa	Ruta de pentosa fosfato (por Glc)	Glicolisis (por Glc)	Conversión de succinil-CoA a succinato (por Glc)	Exceso de CO <sub>2</sub> (por Glc)	Tasa de crecimiento
6025	1	0,26	0,73	0,32	2,35	0,25
6616	1	0,25	0,74	0,12	1,90	0,21
6729	1	0,26	0,73	0,15	1,89	0,24

5 Los resultados muestran que, en comparación con el control 6025, el flujo de succinil-CoA a succinato en las cepas 6616 y 6729 se redujo de 32% a 12% y 15%, respectivamente. La eliminación de  $ycaA$  no alteró significativamente el flujo a través de la ruta de la pentosa fosfato. El exceso de CO<sub>2</sub> por glucosa en 6616 y 6729 se redujo de 2,35 a 1,89-1,90 debido a la disminución de la actividad de succinil-CoA a succinato.

10 Una comparación de las tasas de crecimiento de 6025, 6616 y 6729 muestra que la interrupción de  $ycaA$  y  $cyo$  tienen ambos un efecto significativo en la tasa de crecimiento, en la línea de fondo de la cepa 6025. La cepa con  $ycaA$  eliminado y  $cyd$  como la única citocromo oxidasa (6616) crece a un ritmo significativamente más lento que la cepa en la que están presentes tanto  $cyd$  como  $cyo$  (6729). La reintroducción de la citocromo oxidasa de mayor eficiencia energética aumentó la disponibilidad de ATP por glucosa y alivió parcialmente la escasez de ATP causada por la interrupción del ciclo de TCA.

### Ejemplo III

Reducción de la absorción de oxígeno específico en la cepa de delección de  $YcaA$

Este ejemplo describe una reducción de la absorción específica por célula en cepas con y sin  $YcaA$ .

20 Se espera que las cepas con ciclos de TCA atenuados tengan una menor capacidad para respirar y utilizar el oxígeno. Para evaluar si la eliminación de  $YcaA$  tenía algún efecto sobre la capacidad de absorción de oxígeno, se realizó una fermentación aeróbica por lotes alimentados en cepas con y sin la eliminación de  $YcaA$ . Las cepas evaluadas fueron 6435 y 6729. La cepa 6435 se obtuvo de 6025 con  $cyoABCD$  de tipo salvaje restaurado. La cepa 6729 se obtuvo de 6435 con  $ycaA$  eliminado.

25 Las fermentaciones discontinuas se realizaron con un volumen de cultivo inicial de 1 l en biorreactores Biostat B + de 2 l (Sartorius; Cedex, Francia) utilizando medio mínimo M9 suplementado con 20 g/l de glucosa. La temperatura se controló a 35°C y el pH se controló a 6,75 usando NH<sub>4</sub>OH 2 M o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Las células se cultivaron aeróbicamente y no se impusieron limitaciones de nutrientes. El oxígeno se midió usando una sonda de oxígeno disuelto Presens Oxy4.

30 La biomasa, el tiempo, la tasa de consumo de oxígeno específico (S-OUR) y la tasa de consumo de oxígeno molar específica instantánea (ISMOUR) se muestran en la Tabla 21. La medición de la biomasa se calculó a partir del cultivo OD (equivalente a 1 OD = 0,4 g de peso de células secas por litro). La tasa de consumo de oxígeno molar específica instantánea es la diferencia en la tasa de consumo de oxígeno dividida por la diferencia en la biomasa dividida por el intervalo de tiempo de las mediciones.

Tabla 21. Biomasa, tiempo, S-OUR e ISMOUR en las cepas 6729 y 6435.

Tiempo	Biomasa (g)		S-OUR (mmol/h/g)		ISMOUR (mmol/h/g)	
	6729	6435	6729	6435	6729	6435
0	0,0	0,0				
7	2,2	2,8	3,6	4,5		
10	4,6	7,0	4,2	6,7	3,8	5,4
13	8,2	14,7	4,5	6,4	4,3	6,4

19	18,5	42,3	4,4	5,2	4,4	5,9
----	------	------	-----	-----	-----	-----

En todos los tiempo de la fermentación, la cepa 6729 demostró una tasa de consumo de oxígeno específica reducida en comparación con 6435. La tasa de formación de biomasa también fue más lenta en 6729.

Ejemplo IV

5 La eliminación de YciA combinada con la sobreexpresión de PntAB reduce el exceso de CO<sub>2</sub>

Este ejemplo describe el análisis de flujo de 13C en la fase de crecimiento de cepas de delección de yciA con y sin sobreexpresión basada en plásmidos de transhidrogenasa (pntAB).

10 Desarrollo de vectores de expresión para pntAB. Se obtuvieron estructuras de vectores del Dr. Rolf Lutz de Expressys (expressys.de). Los vectores y las cepas se basan en el sistema de expresión pZ descrito anteriormente (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997)). Específicamente, se obtuvo pZS\*13luc y contenía el gen de luciferasa como un fragmento de relleno. Para reemplazar el fragmento de relleno de luciferasa con un fragmento lacZ-alfa flanqueado por sitios de enzimas de restricción apropiados, el fragmento de relleno de luciferasa se eliminó primero de cada vector por digestión con EcoRI y XbaI. El fragmento lacZ-alfa se amplificó por PCR a partir de pUC19 con los siguientes cebadores:

lacZalpha-RI

5'GACGAATTTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCAGTGGCCGTCGTTTT (SEQ ID NO: 7)

AC3'

lacZalpha 3'BB

15 5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3' (SEQ ID NO: 8).

20 Esto generó un fragmento con un extremo 5' del sitio EcoRI, el sitio NheI, un sitio de unión a ribosomas, un sitio de Sall y el codón de inicio. El extremo 3' del fragmento contenía los sitios codón de parada, XbaI, HindIII y AvrII. El producto PCR se digirió con EcoRI y AvrII y se ligó a los vectores de base digeridos con EcoRI y XbaI (XbaI y AvrII tienen extremos compatibles y generan un no sitio). Debido a que los sitios de las enzimas de restricción NheI y XbaI generan extremos compatibles que pueden unirse entre sí (pero generan un sitio después de la ligadura que no es digerida por ninguna enzima), los genes clonados en los vectores podrían ser "BioBricked" juntos (openwetware.org/wiki/Synthetic\_Biology:BioBricks). Brevemente, este método permite unir un número ilimitado de genes en el vector usando los mismos 2 sitios de restricción, siempre que los sitios no parezcan internos a los genes, porque los sitios entre los genes se destruyen después de cada adición. Inicialmente, la expresión era baja a partir de estos vectores, y posteriormente se modificaron utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Phusion® (NEB, Ipswich, Mass.) para insertar la secuencia espaciadora AATTAA entre los sitios EcoRI y NheI. Esto eliminó una supuesta estructura de bucle de tallo en el ARN que unía el RBS y el codón de inicio.

30 Todos los vectores tienen la designación pZ seguida de letras y números que indican el origen de la replicación, el marcador de resistencia a antibióticos y la unidad promotora / reguladora. El origen de la replicación es la segunda letra y se indica por E para ColE1, A para p15A y S para orígenes basados en pSC101 (así como una versión de número de copia inferior de pSC101 designado como S\*). El primer número representa el marcador de resistencia a los antibióticos (1 para ampicilina, 2 para kanamicina, 3 para cloranfenicol). El número final define el promotor que regula el gen de interés (1 para pLtetO-1, 2 para pLlacO-1 y 3 para pA1lacO-1) y cada uno de estos promotores se activa por su molécula inductora correspondiente (pLtetO puede ser inducido por tetraciclina; pLlacO-1 y pA1lacO-1 pueden ser inducidos por IPTG). Se diseñó adicionalmente un vector base, pZS\*13S.

35 Además de los promotores "inducibles" mencionados anteriormente, se tomó una muestra del registro de un conjunto de promotores "constitutivos" (partsregistry.org). Luego, cada uno de estos promotores "constitutivos" se introdujo en la cadena principal del vector pZS\*13 para reemplazar el promotor inducible pA1lacO-1 mediante el método de clonación independiente de secuencia y ligadura (SLIC) descrito anteriormente (Li et al., Nature Methods 4: 251-256 (2007)). De estos promotores "constitutivos" muestreados (p100, p104, p105, p107, p108, p111, p115 y p119), se llevaron a cabo experimentos para establecer un orden de fuerza del promotor que se verificó por los niveles de expresión de las proteínas. Para estos experimentos, se eligió p115 para la expresión de pntAB. Para reducir aún más los niveles de expresión de proteínas de pntAB, el sitio de unión ribosómico (RBS) entre el promotor y la secuencia de codificación génica se modificó en consecuencia utilizando la calculadora RBS (salis.psu.edu/software/).

45 Los cebadores SLIC utilizados para insertar pntAB en la cadena principal del vector pZS\*13S se muestran a continuación. Las minúsculas marcan las secuencias de recocido a una cadena principal del vector, mientras que las mayúsculas marcan las secuencias de recocido a la región de codificación de un gen.

## 1. pntAB

Cebador SLIC directo: gaggagaagtcgacATGAACGAACAATATTCCGCATTGCG (SEQ ID N°: 9)

Cebador SLIC inverso: ggaagcttctagaTTAGCCGGTATTACGCATACCTGCC (SEC ID N°: 10).

Resultados del análisis de flujo.

- 5 El análisis de flujo  $^{13}\text{C}$  de la fase de crecimiento se realizó como se describió anteriormente para evaluar el impacto de la sobreexpresión de pntAB en el flujo a través de la ruta de la pentosa fosfato, la reacción de succinil-CoA a succinato y el exceso de formación de  $\text{CO}_2$ . Se esperaba que la sobreexpresión de pntAB disminuyera el flujo a través de la ruta de la pentosa fosfato generando NADPH a costa de NADH. La cepa utilizada en este ejemplo es 6729 (6025 + cyoABCD  $\Delta$ cyiA) transformada con uno de los siguientes plásmidos: (1) pZS\* - p115-vector vacío, (2) pZS\* - p115-6K-RBS-pntAB, (3) pZS\* - p115-13K-RBS-pntAB, (4) pZS\* - p115-pntAB. Los plásmidos 2-4 expresan la transhidrogenasa unida a la membrana codificada por pntAB a niveles crecientes, siendo p115-pntAB la expresión más fuerte.

La Tabla 22 muestra la distribución del flujo (por glucosa) entre las rutas metabólicas centrales para cada combinación de cepa / plásmido.

- 15 Tabla 22. La distribución del flujo (por glucosa) entre las rutas metabólicas centrales para la cepa 6729 (6025 + cyoABCD  $\Delta$ cyiA) transformada con uno de los siguientes plásmidos: (1) pZS\*-p115-vector vacío, (2) pZS\*-p115-6K-RBS-pntAB, (3) pZS\*-p115-13K-RBS-pntAB, (4) pZS\*-p115-pntAB.

Cepa	Consumo de glucosa	Ruta de pentosa fosfato (por Glc)	Glicolisis (por Glc)	Conversión de succinil-CoA a succinato (por Glc)	Exceso de $\text{CO}_2$ (por Glc)
1	1	0,26	0,73	0,12	1,96
2	1	0,19	0,80	0,11	1,84
3	1	0,18	0,81	0,09	1,77
4	1	0,12	0,88	0,08	1,78

- 20 El análisis del flujo de la fase de crecimiento confirmó que el pntAB OE disminuyó el exceso de  $\text{CO}_2$  al reducir el flujo a través de la ruta de la pentosa fosfato y el ciclo oxidativo de TCA (controlado por la reacción de succinil-CoA a succinato).

## Ejemplo V

Aumento del rendimiento del crecimiento con la eliminación de CydAB

- 25 Este ejemplo demuestra que se puede obtener un mayor rendimiento del crecimiento al mejorar la eficiencia energética de la cadena de transporte de electrones mediante la eliminación de cydAB.

- 30 El complejo de citocromo bo, codificado por el operón cio, se convierte en el complejo de citocromo oxidasa predominante mediante la eliminación de cydAB, que codifica el complejo de citocromo bd-I. El complejo citocromo bo bombea activamente electrones sobre la membrana y da como resultado una estequiometría  $\text{H} + / 2\text{e}^-$  de 4. El complejo citocromo bd-I no parece bombear activamente protones. Sin embargo, debido a la oxidación del quinol en el lado periplásmico de la membrana y el posterior consumo de protones del lado citoplasmático de la membrana que se utilizan en la formación de agua, la transferencia neta de electrones produce una estequiometría  $\text{H} + / 2\text{e}^-$  de 2. Dado que el complejo citocromo bo tiene una estequiometría de translocación de protones mayor que el complejo citocromo bd-I, la eficiencia energética de la cadena de transporte de electrones puede mejorarse mediante la eliminación de cydAB.

- 35 La cepa huésped 7032 es similar a la 6025 descrita anteriormente. Contiene un operón cyo restaurado de tipo salvaje y es sucCD. La cepa huésped 7143 se deriva de 7032 pero contiene una delección en cydAB. Las delecciones de cydA y cydB se lograron usando un método de recombinación homóloga de doble cruce de dos pasos como se describe en Yim et al. (Yim et al, Nature Chem Biol 7: 445-52 (2011) y el documento US20140030779. La recombinación se catalizó mediante la expresión de los genes Lambda fago Red de pRED-Amp (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania). Los genes que codifican levansucrasa (sacB) de Bacillus subtilis y la resistencia a la kanamicina se integraron en el cromosoma. La Kanamicina se usó para seleccionar integrantes exitosos. En un segundo paso de recombinación homóloga de doble cruce, la secuencia integrada que contiene el gen de levansucrasa y el gen de resistencia a la kanamicina se reemplazó con una secuencia de ADN apropiada (delección o inserción o mutación) y se seleccionaron los clones resistentes a sacarosa para determinar la sensibilidad frente a la kanamicina. Las secuencias de ADN utilizadas en los pasos de recombinación homóloga descritos anteriormente se

construyeron mediante técnicas estándar de biología molecular. Tras la recombinación, la región cromosómica que abarcaba la modificación fue amplificada por PCR y secuenciada con el fin de verificar que la modificación esperada ocurriera según lo planeado. Las regiones flanqueantes (entre 500-1000 nt) que cubren cualquier secuencia reguladora se verificaron por lo tanto.

5 Se usaron los siguientes cebadores para confirmar las eliminaciones de *cydAB*:

Denominación del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO
<i>cydAB</i> F1	AGCCAGGCAGTGGGATTGTG	11
<i>cydAB</i> R1	GGCAAACATCTACATCGCATTC	12

10 Como consecuencia, se eliminaron los siguientes nucleótidos: 1.309.961-1.310.181 (*cydAB*).

Las fermentaciones discontinuas se realizaron con un volumen de cultivo inicial de 1 l en biorreactores Biostat B + de 2 l (Sartorius; Cedex, Francia) utilizando medio mínimo M9 suplementado con 20 g/l de glucosa. La temperatura se controló a 35°C y el pH se controló a 6,75 usando NH<sub>4</sub>OH 2 M o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Las células se cultivaron aeróbicamente hasta que se alcanzó una tasa de consumo máxima de oxígeno basada en el peso (wOUR) de 45 mmol de O<sub>2</sub> / kg / h. En este punto, el suministro de oxígeno total (mmol / h) se mantuvo constante pero debido al aumento del volumen del líquido, el wOUR disminuye gradualmente, lo que resulta en condiciones microaerobias [concentración de oxígeno disuelto (OD) = 0 (es decir, por debajo de los límites de detección); tasa de consumo de oxígeno = tasa de transferencia de oxígeno]. Todos los cultivos alcanzaron DO = 0 a las 9 horas. El tiempo total de fermentación fue de 24 h. Así, gran parte del crecimiento se produjo en condiciones de oxígeno limitado. No se impusieron otras limitaciones de nutrientes. El oxígeno se midió usando una sonda de oxígeno disuelto Presens Oxy4.

15  
20

La biomasa total formada, el oxígeno consumido y la biomasa formada por el oxígeno consumido se presentan en la Tabla 23. El valor de la biomasa se calculó a partir de la DO de cultivo (1 equivalente de OD = 0,4 g de peso de células secas por litro) y el volumen de líquido. La eliminación de *cydAB* permitió que se formara una mayor cantidad de biomasa por molécula de oxígeno consumida. Dado que el rendimiento de la biomasa en el oxígeno es mayor en las cepas de *cyd*, se puede usar un pico más bajo de wOUR para generar la misma cantidad de masa celular que las cepas de *cyd+*. Por lo tanto, las pérdidas de rendimiento respiratorio frente a CO<sub>2</sub> son menores en las cepas de *cyd* en comparación con las cepas de *cyd+*.

25

Tabla 23. La formación de biomasa total, el oxígeno consumido y la biomasa generada por oxígeno consumido se proporcionan para las cepas 7032 y 7143 a las 24 horas de fermentación.

Cepa	Plásmido	Modificaciones metabólicas clave	Biomasa formada (g)	O <sub>2</sub> consumido (mmol)	Biomasa/O <sub>2</sub> consumido (g/mmol)
7032	ninguno	sucCD	20,5	898	0,023
7143	ninguno	sucCD, <i>cydAB</i>	26,3	918	0,029

30

#### Ejemplo VI

Aumento del rendimiento del producto de cepas de delección de *SucCD* *CydAB* por eliminación de *PykF* y / o sobreexpresión de *PntAB*

Este ejemplo demuestra que la producción de BDO por biomasa puede incrementarse en cepas de delección de *sucCD* *cydAB* por la sobreexpresión de *pntAB* y / o la delección de *pykF*.

35

Se eliminó *pykF* en la cepa 7143 descrita en el Ejemplo V. La cepa 7143 carece tanto de *sucCD* como de *cydAB*. La eliminación de *pykF* de la cepa 7143 dio como resultado la cepa 7342. La eliminación de *pykF* se logró utilizando un método de recombinación homóloga de paso cruzado y dos pasos como se describió anteriormente (Yim et al, Nature Chem Biol 7: 445-52 (2011)) y el documento US20140030779. Se usaron los siguientes cebadores para confirmar la eliminación de *pykF*:

40

Denominación del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO
<i>pykF</i> F1	AGCCAGGCAGTGGGATTGTG	13
<i>pykF</i> R1	GGCAAACATCTACATCGCATTC	14

Como consecuencia, se eliminaron los siguientes nucleótidos: 1.309.961-1.310.181 (*pykF*).

5 Los genes pntAB se sobreexpresaron en las cepas 7143 y 7342 usando los vectores de expresión descritos en el Ejemplo IV. pZS\*-p115-13K-RBS-pntAB da como resultado una expresión de pntAB menor que pZS\*-p115-pntAB debido a la menor fuerza de la RBS. Las cepas se cultivaron en una placa de 96 pocillos como se describe en el Ejemplo I. La Tabla 24 muestra que la cantidad de BDO sintetizada por biomasa generada aumenta con la eliminación de pykF. La Tabla 24 también muestra que este aumento se magnifica tanto en la cepa 7143 como en la cepa 7342 al sobreexpresar pntAB.

Tabla 24. Producción de BDO por OD en las cepas 7143 y 7342 con y sin mayor expresión de pntAB. Los promedios de cuatro cultivos replicados se muestran después de 24 horas de tiempo de cultivo en placas de 96 pocillos.

Cepa	Plásmido	Modificaciones metabólicas clave	BDO (mM)/OD
7143	ninguno	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB	16,3
7143	pZS*-p115-13k-RBS-pntAB	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, pntAB sobreexpresado	24,2
7143	pZS*-p115-pntAB	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, pntAB sobreexpresado	23,1
7342	ninguno	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, $\Delta$ pykF	17,8
7342	pZS*-p115-13k-RBS-pntAB	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, $\Delta$ pykF, pntAB sobreexpresado	18,8
7342	pZS*-p115-pntAB	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, $\Delta$ pykF, pntAB sobreexpresado	19,5

10 Ejemplo VII. Aumento del rendimiento del producto de cepas de eliminación de SucCD CvdAB YciA tras la eliminación de PykF y / o la sobreexpresión de PntAB

Este ejemplo demuestra que la producción de BDO por biomasa se puede aumentar en cepas de delección sucCD cydAB yciA por la sobreexpresión de pntAB y / o la delección de pykF.

15 Se eliminó yciA en la cepa 7143 descrita en el Ejemplo V. La cepa 7143 carece de sucCD y cydAB. La eliminación de yciA de la cepa 7143 dio como resultado la cepa 7170. La eliminación de yciA se logró usando un método de recombinación homóloga de cruce doble de dos pasos como se describe en Yim et al. (Yim et al, Nature Chem Biol 7: 445-52 (2011) y el documento US20140030779. Se usaron los siguientes cebadores para confirmar la eliminación de yciA:

Denominación del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO
20 yciA F1	AGCCAGGCAGTGGGATTGTG	15
yciA R1	GGCAAACATCTACATCGCATTG	16

Como consecuencia, se eliminaron los siguientes nucleótidos: 1.309.961-1.310.181 (yciA).

25 pykF se eliminó en la cepa 7170. La cepa 7170 carece de sucCD, yciA y cydAB. La eliminación de pykF de la cepa 7170 dio como resultado la cepa 7341. La eliminación de pykF se logró utilizando un método de recombinación homóloga de doble cruce de dos pasos como se describe en Yim et al. (Yim et al, Nature Chem Biol 7: 445-52 (2011) y el documento US20140030779. Se usaron los siguientes cebadores para confirmar la eliminación de pykF:

Denominación del cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO
pykF F1	AGCCAGGCAGTGGGATTGTG	17
30 pykF R1	GGCAAACATCTACATCGCATTG	18

Como consecuencia, se eliminaron los siguientes nucleótidos: 1.309.961-1.310.181 (pykF).

35 Los genes pntAB se sobreexpresaron en las cepas 7170 y 7341 usando los vectores de expresión descritos en el Ejemplo IV. pZS\*-p115-13K-RBS-pntAB da como resultado una expresión de pntAB menor que pZS\*-p115-pntAB debido a la menor fuerza de la RBS. Las cepas se cultivaron en una placa de 96 pocillos como se describe en el Ejemplo I. La Tabla 25 muestra que la cantidad de BDO sintetizada por biomasa generada aumenta tras la eliminación de pykF. La Tabla 25 también muestra que este aumento se amplía tanto en la cepa 7170 como en la cepa 7341 al aumentar la expresión de pntAB.

Tabla 25. Producción de BDO por OD en las cepas 7170 y 7341 con y sin mayor expresión de pntAB. Los promedios de cuatro cultivos replicados se muestran después de 24 horas de tiempo de cultivo en placas de 96 pocillos.

Cepa	Plásmido	Modificaciones metabólicas clave	BDO (mM)/OD
7170	Ninguno	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, $\Delta$ yciA	17,5
7170	pZS*-p115-13k-RBS-pntAB	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, $\Delta$ yciA, pntAB sobreexpresado	21,9
7170	pZS*-p115-pntAB	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, $\Delta$ yciA, pntAB sobreexpresado	20,1
7341	Ninguno	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, $\Delta$ cydA, $\Delta$ pykF	18,9
7341	pZS*-p115-pntAB	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ cydAB, $\Delta$ yciA, $\Delta$ pykF, pntAB sobreexpresado	25,0

5 Ejemplo VIII. Aumento de la producción de BDO de la cepa de delección de SucCD PykF por sobreexpresión de PntAB

Este ejemplo demuestra que la producción de BDO se puede aumentar en una cepa sucCD pykF sobreexpresando pntAB.

10 La cepa huésped 7032 es similar a la cepa 6025 descrita anteriormente. Contiene un operón cyo restaurado de tipo salvaje y es sucCD. Los genes pntAB se sobreexpresaron en la cepa 7032 usando los vectores de expresión descritos en el Ejemplo IV. pZS\*-p115-13K-RBS-pntAB da como resultado una expresión de pntAB menor que pZS\*-p115-pntAB debido a la menor resistencia de la RBS. Las cepas se cultivaron en una placa de 96 pocillos como se describe en el Ejemplo I. La Tabla 26 muestra que la cantidad de BDO sintetizado aumenta al sobreexpresar pntAB.

Tabla 26. Producción de BDO en la cepa 7023 con y sin mayor expresión de pntAB. Los promedios de cuatro cultivos replicados se muestran después de 24 horas de tiempo de cultivo en placas de 96 pocillos.

Cepa	Plásmido	Modificaciones metabólicas clave	BDO (mM)/OD
7023	ninguno	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ pykF	50,0
7023	pZS*-p115-13k-RBS-pntAB	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ pykF, pntAB sobreexpresado	62,3
7023	pZS*-p115-pntAB	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ pykF, pntAB sobreexpresado	53,0

15 Ejemplo IX

Aumento de la producción de BDO de la cepa de eliminación de SucCD YciA al eliminar Cyd

Este ejemplo demuestra que la producción de BDO puede aumentarse en una cepa sucCD yciA eliminando cydAB.

20 La cepa huésped 7313 es similar a la cepa 7341 descrita anteriormente. Ambas cepas contienen un operón cyo restaurado de tipo salvaje y son pykF, yciA y sucCD. La cepa 7341 contiene una delección en los genes cydAB. La Tabla 27 muestra que la cantidad de BDO sintetizada aumenta en la cepa 7341 frente a 7313.

Tabla 27. Producción de BDO en cepas 7313 y 7341. Los promedios de cuatro cultivos replicados se muestran después de 24 horas de tiempo de cultivo en placas de 96 pocillos.

Cepa	Plásmido	Modificaciones metabólicas clave	BDO (mM)/OD
7313	ninguno	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ yciA, $\Delta$ pykF	47
7341	ninguno	$\Delta$ sucCD, $\Delta$ yciA, $\Delta$ pykF, $\Delta$ cydAB	57

25 Ejemplo X

Tasa de crecimiento mejorada en la eliminación de ClpA

Este ejemplo demuestra una tasa de crecimiento mejorada en cepas con proteína ClpA inactivada o una delección del gen clpA.

- 5 ClpA es el componente de chaperona dependiente de ATP de los complejos de proteasa ClpAP y ClpAXP, miembros de un grupo diverso de complejos de chaperona / proteasa dependientes de energía (Reid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (7): 3768-3772 (2001); Kessel et al., J. Mol. Biol. 250(5):587-594 (1995)). La proteasa ClpAP funciona en diversas actividades celulares, incluida la degradación de proteínas agregadas y marcadas con *ssrA*, la adaptación y la capacidad de supervivencia en la fase estacionaria y la regulación de proteínas que responden a la escasez de carbono y al estrés ambiental (Gottesman et al, Genes Dev. 12:1338-47 (1998)).

Proteína	ID Genbank	Número GI	Organismo
clpA	NP_415403.1	GI:16128850	Escherichia coli
clpP	NP_414971.1	16128422	Escherichia coli
clpX	NP_414972.1	16128423	Escherichia coli

- 10 Restauración de clpA en 5723. Los experimentos fueron diseñados para probar si la restauración de clpA a tipo salvaje tenía algún efecto en el crecimiento. Se encontró una delección de pares de bases (en el par de bases 254) en el gen clpA en una cepa. El efecto funcional de esta eliminación es el truncamiento prematuro y, por lo tanto, la inactivación de la proteína ClpA y los complejos de proteasa ClpAP y ClpAPX. El gen clpA se restauró a tipo salvaje en 5723 y se probaron las diferencias de crecimiento entre clpA de tipo salvaje y clpA con la mutación. Una versión de la cepa con un casete SacBkan insertó 500 pares de bases en el gen clpA.
- 15

Las cepas se probaron para determinar el crecimiento en medio FM1 en la Bioscreen. Restaurar el gen clpA a su forma de tipo salvaje perjudica ligeramente el crecimiento en 5723. La versión con el casete SacBkan no tiene el mismo deterioro. Estos resultados indican que la eliminación o atenuación del componente ClpA de la proteasa mejoró la tasa de crecimiento.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un organismo microbiano no natural que comprende una modificación genética de la atenuación de *cydA* o *cydB*, y una o más de una modificación genética que aumenta la expresión de una proteína codificada por *pntAB*.
2. El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 1, que además tiene una atenuación de *sucCD*.
- 5 3. El organismo microbiano que no se produce naturalmente de la reivindicación 1, que además tiene una atenuación de *pykF*.
4. El organismo microbiano de origen no natural de la reivindicación 1, que además tiene una atenuación de *sucCD* y *pykF*.
5. El organismo microbiano no natural de la reivindicación 1, que además tiene una atenuación de *sucCD* y *yciA*.
- 10 6. El organismo microbiano no natural de la reivindicación 1, que además tiene una atenuación de *sucCD*, *pykF* y *yciA*.
7. El organismo microbiano no natural de la reivindicación 1, que además tiene una atenuación de *sucCD*, *yciA* y *menC*.
- 15 8. El organismo microbiano no natural de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una ruta de ingeniería metabólica para producir un compuesto bioderivado a partir de un intermedio del ciclo TCA o un sustrato del ciclo TCA; en el que opcionalmente dicho compuesto bioderivado se selecciona del grupo que consiste en 4-hidroxibutirato (4HB), 1,4-butanodiol (1,4-BDO), 1,3-butanodiol (1,3-BDO), polihidroxiilbutanoato (PHB), butadieno, adipato, 6-aminocaproato, caprolactama, ácido metacrílico, isopropanol, alcoholes de cadena larga, hexametildiamina, metacrilato de metilo, butanol, 3-buten-1-ol, 3-buten-2-ol y alcohol crotilico.
- 20 9. El organismo microbiano de origen no natural de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el rendimiento del compuesto bioderivado aumenta en relación con la ausencia de dicha modificación genética.
10. El organismo microbiano no natural de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho organismo microbiano se selecciona del grupo que consiste en bacterias, levaduras, hongos u otro microorganismo aplicable a un proceso de fermentación; en el que opcionalmente dicho organismo microbiano es una bacteria; en donde  
25 opcionalmente dicha bacteria es *Escherichia coli*.
11. Un método para producir un compuesto bioderivado que comprende cultivar un organismo microbiano no natural de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 durante un período de tiempo suficiente en condiciones suficientes para producir dicho compuesto bioderivado.



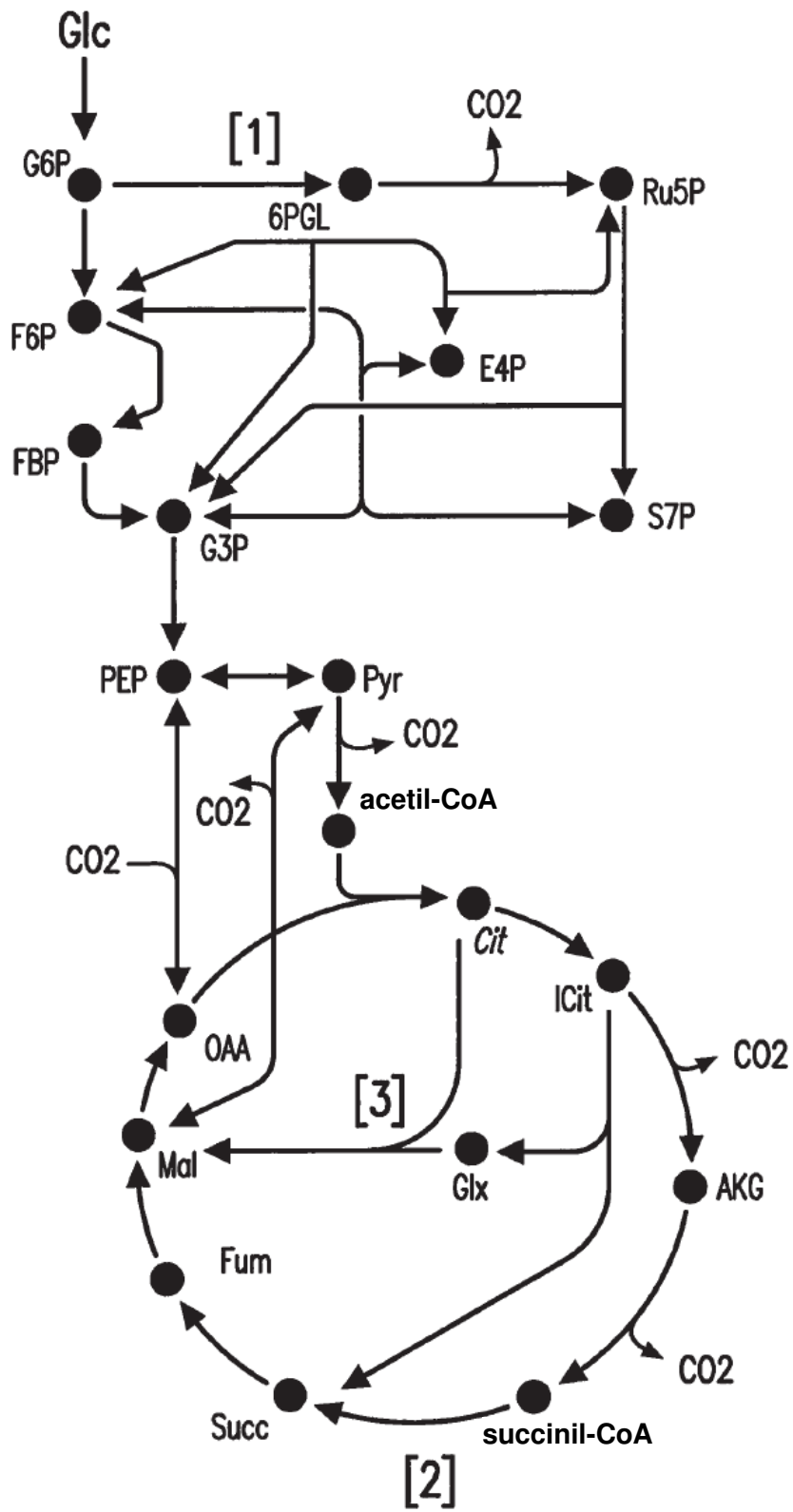


FIG. 1