

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 867**

51 Int. Cl.:

C12P 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08732315 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2137315**

54 Título: **Composiciones y métodos para la biosíntesis de 1,4-butanodiol y sus precursores**

30 Prioridad:

16.03.2007 US 918463 P

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

30.01.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BURK, MARK J.;
VAN DIEN, STEPHEN J.;
BURGARD, ANTHONY y
NIU, WEI**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 527 867 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

Composiciones y métodos para la biosíntesis de 1,4-butanodiol y sus precursores

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere de manera general al diseño *in silico* de organismos y, más particularmente a organismos que tienen capacidad de biosíntesis de 1,4-butanodiol.

10 El compuesto ácido 4-hidroxi-butanoico (4-hidroxi-butanoato, 4-hidroxi-butirato, 4-HB) es un ácido carboxílico de 4 carbonos que tiene potencial industrial como elemento estructural para diversos productos químicos de materia prima y especializados. En particular, 4-HB tiene potencial para servir como nuevo punto de entrada en la familia de productos químicos de 1,4-butanodiol, que incluye disolventes, resinas, precursores de polímeros y productos químicos especializados. El 1,4-butanodiol (BDO) es un producto intermedio de polímeros y disolvente industrial con un mercado global de aproximadamente 3 billones de lb/año. BDO se produce actualmente a partir de precursores petroquímicos, principalmente acetileno, anhídrido maleico y óxido de propileno.

Por ejemplo, se hace reaccionar acetileno con 2 moléculas de formaldehído en la reacción de síntesis de Reppe (Kroschwitz y Grant, Encyclopedia of Chem. Tech., John Wiley and Sons, Inc., Nueva York (1999)), seguido por hidrogenación catalítica para formar 1,4-butanodiol. Se ha estimado que el 90% del acetileno producido en los EE.UU. se consume para la producción de butanodiol. Alternativamente, puede formarse mediante esterificación e hidrogenación catalítica de anhídrido maleico, que se deriva de butano. Posteriormente, puede transformarse adicionalmente el butanodiol; por ejemplo, mediante oxidación para dar γ -butirolactona, que puede convertirse adicionalmente en pirrolidona y N-metil-pirrolidona, o hidrogenólisis para dar tetrahidrofurano (figura 1). Estos compuestos tienen diversos usos como productos intermedios de polímeros, disolventes y aditivos, y tienen un mercado combinado de casi 2 billones de lb/año.

30 Resulta deseable desarrollar un método para la producción de estos productos químicos mediante medios alternativos que no sólo sustituyan materias primas basadas en petróleo por renovables, y que también usen procedimientos que requieran menos energía y capital. El Departamento de Energía ha propuesto 1,4-diácidos, y particularmente ácido succínico, como productos intermedios clave producidos de manera biológica para la fabricación de la familia de productos de butanodiol (Informe del DOE, "Top Value-Added Chemicals from Biomass", 2004). Sin embargo, el ácido succínico es costoso de aislar y purificar y requiere altas temperaturas y presiones para su reducción catalítica para dar butanodiol.

35 Por tanto, existe una necesidad de medios alternativos para producir eficazmente cantidades comerciales de 1,4-butanodiol y sus precursores químicos. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

40 **Sumario de la invención**

La invención se define por el contenido de las reivindicaciones.

45 La descripción proporciona un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural que incluye un organismo microbiano que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA o α -cetoglutarato descarboxilasa, en el que el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir ácido 4-hidroxi-butanoico monomérico (4-HB). También se proporciona un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural que incluye un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO), las rutas incluyen al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa, 4-butirato cinasa, fosfotransbutirilasa, α -cetoglutarato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o una aldehído/alcohol deshidrogenasa, en el que el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir 1,4-butanodiol (BDO). Adicionalmente, se proporciona un método para la producción de 4-HB. El método incluye cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA o α -cetoglutarato descarboxilasa en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir ácido 4-hidroxi-butanoico monomérico (4-HB). Además, se proporciona un método para la producción de BDO. El método incluye cultivar un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO), incluyendo las rutas al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa, 4-hidroxi-butirato cinasa, fosfotranshidroxibutirilasa, α -cetoglutarato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o una aldehído/alcohol deshidrogenasa durante un periodo de

tiempo suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO). Los productos 4-HB y/o BDO pueden secretarse al medio de cultivo.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un punto de entrada de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) en la línea de productos de la familia de productos químicos de 1,4-butanodiol (BDO), y la comparación con rutas de síntesis química a partir de materias primas petroquímicas. Las flechas negras continuas muestran rutas de síntesis química; las flechas azules discontinuas muestran una ruta biosintética para dar 4-HB y posteriores etapas de conversión para dar productos químicos de la familia de BDO.

15 La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra rutas bioquímicas para dar 4-hidroxi-butirato (4-HB) y para la producción de 1,4-butanodiol. Las primeras 5 etapas son endógenas para *E. coli*, mientras que el resto pueden expresarse de manera heteróloga. Las enzimas que catalizan las reacciones biosintéticas son: (1) succinil-CoA sintetasa; (2) semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA; (3) α -cetoglutarato deshidrogenasa; (4) glutamato:succinato semialdehído transaminasa; (5) glutamato descarboxilasa; (6) semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA; (7) 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa; (8) α -cetoglutarato descarboxilasa; (9) 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa; (10) butirato cinasa; (11) fosfotransbutirilasa; (12) aldehído deshidrogenasa; (13) alcohol deshidrogenasa.

20 La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra la biosíntesis de homoserina en *E. coli*.

25 La figura 4 muestra un diagrama esquemático de una biorruta de homoserina predicha a partir de L-homoserina para dar 4-HB. La etapa 1 es una amoniaco liasa deducida (clase EC 4.3.1) con una $\Delta r_{xn}G$ estimada de 12 kJ/mol. La etapa 2 es una oxidoreductasa deducida (clase EC 1.3.1) con una $\Delta r_{xn}G$ estimada de -59 kJ/mol.

La figura 5 muestra un diagrama esquemático para la ruta de *E. coli* endógena para la conversión de aspartato en succinato por medio de fumarato. Esta ruta muestra una química similar a la biorruta de homoserina predicha.

30 La figura 6 muestra un diagrama esquemático que ilustra los paralelismos entre las rutas biosintéticas de (A) homoserina y (B) succinil-CoA para dar BDO.

La figura 7 es un diagrama esquemático que muestra las rutas bioquímicas para dar acetoacetato en *E. coli*.

35 La figura 8 es un diagrama esquemático que muestra una ruta bioquímica a partir de acetoacetato para dar BDO por medio de semialdehído succínico.

La figura 9 es un diagrama esquemático que muestra un esquema de reacción de D-lisina-5,6-aminomutasa.

40 La figura 10 es un diagrama esquemático que muestra una ruta para dar acetoacetato a partir de acetil-CoA. Las enzimas son: (1) piruvato-formiato liasa, (2) piruvato deshidrogenasa, (3) acetil-CoA:acetoacetil-CoA transferasa, (4) acetil-CoA C-acetil transferasa, (5) fosfotransacetilasa y (6) acetato cinasa. La enzima 7 representa la ruta de múltiples etapas de acetoacetato a BDO en la figura 8.

45 La figura 11 muestra la producción de 4-HB en medio mínimo de glucosa usando cepas de *E. coli* que albergan plásmidos que expresan diversas combinaciones de genes de la ruta de 4-HB. (a) Concentración de 4-HB en caldo de cultivo; (b) concentración de succinato en caldo de cultivo; (c) DO de cultivo, medida a 600 nm. Las agrupaciones de barras representan los puntos de tiempo de 24 horas, 48 horas y 72 horas (si se mide). Los códigos a lo largo del eje de las X indican la combinación de cepa/plásmido usada. El primer índice se refiere a la cepa huésped: 1, MG1655 $lacI^Q$; 2, MG1655 $\Delta gabD lacI^Q$; 3, MG1655 $\Delta gabD \Delta aldA lacI^Q$. El segundo índice se refiere a la combinación de plásmidos usada: 1, pZE13-0004-0035 y pZA33-0036; 2, pZE13-0004-0035 y pZA33-0010n; 3, pZ13-0004-0008 y pZA33-0036; 4, pZ13-0004-0008 y pZA33-0010n; 5, vectores de control pZE13 y pZA33.

55 La figura 12 muestra la producción de 4-HB a partir de glucosa en cepas de *E. coli* que expresan α -cetoglutarato descarboxilasa a partir de *Mycobacterium tuberculosis*. Las cepas 1-3 contienen pZE13-0032 y pZA33-0036. La cepa 4 sólo expresa los vectores vacíos pZE13 y pZA33. Las cepas huésped son las siguientes: 1 y 4, MG1655 $lacI^Q$; 2, MG1655 $\Delta gabD lacI^Q$; 3, MG1655 $\Delta gabD \Delta aldA lacI^Q$. Las barras se refieren a la concentración a las 24 y 48 horas.

60 La figura 13 muestra la producción de BDO a partir de 4-HB 10 mM en cepas de *E. coli* recombinantes. Las posiciones numeradas corresponden a experimentos con MG1655 $lacI^Q$ que contiene pZA33-0024, que expresa *cat2* de *P. gingivalis*, y los siguientes genes expresados en pZE13: 1, ninguno (control); 2, 0002; 3, 0003; 4, 0003n; 5, 0011; 6, 0013; 7, 0023; 8, 0025; 9, 0008n; 10, 0035. Los números de genes se definen en la tabla 6. Para cada posición, las barras se refieren a las condiciones aerobias, microaerobias y anaerobias, respectivamente. Se crearon condiciones microaerobias sellando los tubos de cultivo pero sin evacuarlos.

65

La figura 14 muestra el espectro de masas de 4-HB y BDO producidos mediante MG1655 lacl^Q pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036 que se hizo crecer en medio mínimo M9 suplementado con glucosa sin marcar 4 g/l (a, c, e y g), glucosa marcada uniformemente con ^{13}C (b, d, f y h). (a) y (b), fragmento característico de masa 116 de BDO derivatizado, que contiene 2 átomos de carbono; (c) y (d), fragmento característico de masa 177 de BDO derivatizado, que contiene 1 átomo de carbono; (e) y (f), fragmento característico de masa 117 de 4-HB derivatizado, que contiene 2 átomos de carbono; (g) y (h), fragmento característico de masa 233 de 4-HB derivatizado, que contiene 4 átomos de carbono.

La figura 15 es un diagrama de flujo de procedimiento esquemático de bioprocedimientos para la producción de γ -butirolactona. El panel (a) ilustra la fermentación de alimentación discontinua con separación discontinua y el panel (b) ilustra la fermentación de alimentación discontinua con separación continua.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere al diseño y a la producción de células y organismos que tienen capacidades de producción biosintética para ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB), γ -butirolactona y 1,4-butanodiol. En una realización, la invención usa modelos estequiométricos *in silico* del metabolismo de *Escherichia coli* que identifican diseños metabólicos para la producción biosintética de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO). Los resultados descritos en el presente documento indican que pueden diseñarse rutas metabólicas y modificarse por ingeniería genética de manera recombinante para lograr la biosíntesis de 4-HB y productos posteriores tales como 1,4-butanodiol en *Escherichia coli* y otras células u organismos. La producción biosintética de 4-HB, por ejemplo, para los diseños *in silico* puede confirmarse mediante la construcción de cepas que tienen el genotipo metabólico diseñado. Estas células u organismos modificados por ingeniería genética de manera metabólica también pueden someterse a evolución adaptativa para aumentar adicionalmente la biosíntesis de 4-HB, incluyendo en condiciones que se aproximan al crecimiento máximo teórico.

Tal como se describe en el presente documento, las características de biosíntesis de 4-HB de las cepas diseñadas las hacen genéticamente estables y particularmente útiles en bioprocedimientos en continuo. Se identificaron estrategias de diseño de cepas separadas con la incorporación de diferentes capacidades de reacción no nativas o heterólogas en *E. coli* que condujeron a rutas metabólicas de producción de 4-HB y 1,4-butanodiol a partir de o bien semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa y semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, o bien glutamato:semialdehído succínico transaminasa. Se identificaron diseños metabólicos *in silico* que dieron como resultado la biosíntesis de 4-HB tanto en *E. coli* como en especies de levadura a partir de cada una de estas rutas metabólicas. El producto intermedio de 1,4-butanodiol, γ -butirolactona, puede generarse en cultivo mediante ciclación espontánea en condiciones a $\text{pH} < 7,5$, particularmente en condiciones ácidas, tales como por debajo de $\text{pH} 5,5$, por ejemplo, $\text{pH} < 7$, $\text{pH} < 6,5$, $\text{pH} < 6$, y particularmente a $\text{pH} < 5,5$ o inferior.

Las cepas identificadas mediante el componente computacional de la plataforma pueden ponerse en producción real diseñando mediante ingeniería genética cualquiera de las alteraciones metabólicas predichas que conducen a la producción biosintética de 4-HB, 1,4-butanodiol u otro producto intermedio y/o productos posteriores. En aún una realización adicional, pueden someterse adicionalmente cepas que muestran producción biosintética de estos compuestos a evolución adaptativa para aumentar adicionalmente la biosíntesis de producto. Los niveles de biosíntesis de producto proporcionados tras la evolución adaptativa también pueden predecirse mediante el componente computacional del sistema.

Tal como se describe en el presente documento, se construyeron organismos microbianos para expresar una ruta biosintética de 4-HB que codifica para las etapas enzimáticas desde succinato hasta 4-HB y hasta 4-HB-CoA. La expresión conjunta de succinato coenzima A transferasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxi-butirato deshidrogenasa dependiente de NAD y 4-hidroxi-butirato coenzima A transferasa en un organismo microbiano huésped dio como resultado una producción significativa de 4-HB en comparación con organismos microbianos huésped que carecían de una ruta biosintética de 4-HB. Según la invención, se generaron organismos microbianos productores de 4-HB que usaron α -cetoglutarato como sustrato introduciendo ácidos nucleicos que codificaban para α -cetoglutarato descarboxilasa y 4-hidroxi-butirato deshidrogenasa dependiente de NAD.

Según la invención, se construyeron organismos microbianos que contenían una ruta biosintética de 1,4-butanodiol (BDO) que biosintetizaban BDO cuando se cultivaban en presencia de 4-HB. La ruta biosintética de BDO consistía o bien en un ácido nucleico que codificaba para una aldehído/alcohol deshidrogenasa multifuncional o bien ácidos nucleicos que codificaban para una aldehído deshidrogenasa y una alcohol deshidrogenasa. Para soportar el crecimiento sobre sustratos de 4-HB, estos organismos microbianos productores de BDO también expresaban 4-hidroxi-butirato CoA transferasa o 4-butirato cinasa junto con fosfotranshidroxi-butirilasa. Según la invención, se generaron organismos microbianos que sintetizaban BDO mediante expresión exógena de ácidos nucleicos que codificaban para una ruta biosintética de 4-HB funcional y una ruta biosintética de BDO funcional. La ruta biosintética de 4-HB consistía en 4-hidroxi-butirato deshidrogenasa dependiente de NAD y 4-hidroxi-butirato coenzima A

transferasa. La ruta de BDO consistía en una aldehído/alcohol deshidrogenasa multifuncional.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “que no se produce de manera natural”, cuando se usa con referencia a un microorganismo u organismo microbiano de la invención, signifique que el organismo microbiano tiene al menos una alteración genética que no se encuentra normalmente en una cepa que se produce de manera natural de la especie a la que se hace referencia, incluyendo cepas de tipo natural de la especie a la que se hace referencia. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican para polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácido nucleico, deleciones de ácido nucleico y/u otra alteración funcional del material genético microbiano. Tal modificación incluye, por ejemplo, regiones codificantes y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para la especie a la que se hace referencia. Las modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. Los polipéptidos metabólicos a modo de ejemplo incluyen enzimas dentro de una ruta biosintética de 4-HB y enzimas dentro de una ruta biosintética para una familia de compuestos de BDO.

Una modificación metabólica se refiere a una reacción bioquímica que se altera con respecto a su estado que se produce de manera natural. Por tanto, microorganismos que no se producen de manera natural que tienen modificaciones genéticas en ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos metabólicos o fragmentos funcionales de los mismos. A continuación se describen modificaciones metabólicas a modo de ejemplo tanto para *E. coli* como para organismos microbianos de levaduras.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “aislado”, cuando se usa con referencia a un organismo microbiano, signifique un organismo que está sustancialmente libre de al menos un componente tal como se encuentra en la naturaleza el organismo microbiano al que se hace referencia. El término incluye un organismo microbiano que se retira de algunos o todos los componentes tal como se encuentra en su entorno natural. El término también incluye un organismo microbiano que se retira de algunos o todos los componentes tal como se encuentra el organismo microbiano en entornos que no se producen de manera natural. Por tanto, un organismo microbiano aislado está parcial o completamente separado de otras sustancias tal como se encuentra en la naturaleza o tal como se hace crecer, se almacena o subsiste en entornos que no se producen de manera natural. Los ejemplos específicos de organismos microbianos aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio que no se produce de manera natural.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que los términos “microbiano”, “organismo microbiano” o “microorganismo” signifiquen cualquier organismo que existe como célula microscópica que se incluye dentro de los dominios de arqueas, bacterias o eucariotas. Por tanto, se pretende que el término abarque células u organismos procariontes o eucariotas que tienen un tamaño microscópico e incluyen bacteria, arqueas y eubacterias de todas las especies así como microorganismos eucariotas tales como levaduras y hongos. El término también incluye cultivos celulares de cualquier especie que puede cultivarse para la producción de un producto bioquímico.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “ácido 4-hidroxi-butanoico” signifique un derivado de 4-hidroxilo de ácido butírico que tiene la fórmula química $C_4H_8O_3$ y una masa molecular de 104,11 g/mol (126,09 g/mol para su sal de sodio). El compuesto químico ácido 4-hidroxi-butanoico también se conoce en la técnica como 4-HB, 4-hidroxi-butirato, ácido gamma-hidroxi-butírico o GHB. Se pretende que el término, tal como se usa en el presente documento, incluya cualquiera de las diversas formas de sal del compuesto e incluye, por ejemplo, 4-hidroxi-butanoato y 4-hidroxi-butirato. Los ejemplos específicos de formas de sal para 4-HB incluyen 4-HB de sodio y 4-HB de potasio. Por tanto, los términos ácido 4-hidroxi-butanoico, 4-HB, 4-hidroxi-butirato, 4-hidroxi-butanoato, ácido gamma-hidroxi-butírico y GHB así como otros nombres reconocidos en la técnica se usan de manera sinónima en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “monomérico”, cuando se usa con referencia a 4-HB, signifique 4-HB en una forma no polimérica o no derivatizada. Los ejemplos específicos de 4-HB polimérico incluyen poli-(ácido 4-hidroxi-butanoico) y copolímeros, por ejemplo, de 4-HB y 3-HB. Un ejemplo específico de una forma derivatizada de 4-HB es 4-HB-CoA. En la técnica también se conocen otras formas de 4-HB poliméricas y otras formas derivatizadas de 4-HB.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “ γ -butirolactona” signifique una lactona que tiene la fórmula química $C_4H_6O_2$ y una masa molecular de 86,089 g/mol. El compuesto químico γ -butirolactona también se conoce en la técnica como GBL, butirolactona, 1,4-lactona, 4-butirolactona, lactona del ácido 4-hidroxi-butírico y lactona del ácido gamma-hidroxi-butírico. Se pretende que el término tal como se usa en el presente documento incluya cualquiera de las diversas formas de sal del compuesto.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “1,4-butanodiol” signifique un derivado de alcohol del alcano butano, que lleva dos grupos hidroxilo, que tiene la fórmula química $C_4H_{10}O_2$ y una masa molecular de 90,12 g/mol. El compuesto químico 1,4-butanodiol también se conoce en la técnica como BDO y es un producto intermedio químico o precursor para una familia de compuestos denominada en el presente documento familia de compuestos de BDO, algunos de los cuales se muestran a modo de ejemplo en la figura 1.

5 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “tetrahidrofurano” signifique un compuesto orgánico heterocíclico correspondiente al análogo completamente hidrogenado del compuesto aromático furano que tiene la fórmula química C_4H_8O y una masa molecular de 72,11 g/mol. El compuesto químico tetrahidrofurano también se conoce en la técnica como THF, tetrahidrofurano, 1,4-epoxibutano, óxido de butileno, óxido de ciclotetrametileno, oxaciclopentano, óxido de dietileno, oxolano, furanidina, hidrofurano, óxido de tetra-metileno. Se pretende que el término tal como se usa en el presente documento incluya cualquiera de las diversas formas de sal del compuesto.

10 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “CoA” o “coenzima A” signifique un cofactor orgánico o grupo prostético (parte no proteica de una enzima) cuya presencia se requiere para la actividad de muchas enzimas (la apoenzima) para formar un sistema enzimático activo. La coenzima A funciona en determinadas enzimas de condensación, actúa en la transferencia de acetilo u otro grupo acilo y en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, oxidación de piruvato y en otra acetilación.

15 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “sustancialmente anaerobio”, cuando se usa con referencia a una condición de cultivo o crecimiento, signifique que la cantidad de oxígeno es inferior a aproximadamente el 10% de saturación para oxígeno disuelto en medios líquidos. También se pretende que el término incluya cámaras selladas de medio líquido o sólido mantenido con una atmósfera de menos de
20 aproximadamente el 1% de oxígeno.

Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención pueden contener alteraciones genéticas estables, lo cual se refiere a microorganismos que pueden cultivarse durante más de cinco generaciones sin pérdida de la alteración. Generalmente, las alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que
25 persisten más de 10 generaciones, particularmente las modificaciones estables persistirán más de aproximadamente 25 generaciones, y más particularmente, las modificaciones genéticas estables serán de más de 50 generaciones, incluyendo indefinidamente.

Los expertos en la técnica entenderán que las alteraciones genéticas, incluyendo las modificaciones metabólicas mostradas a modo de ejemplo en el presente documento, se describen con referencia a genes de *E. coli* y de levadura y sus correspondientes reacciones metabólicas. Sin embargo, dada la secuenciación del genoma completo de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de experiencia en el campo de la genómica, los expertos en la técnica podrán aplicar fácilmente las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento esencialmente a todos los demás organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de *E. coli* mostradas a
30 modo de ejemplo en el presente documento pueden aplicarse fácilmente a otras especies incorporando el mismo ácido nucleico codificante, o uno análogo, de una especie distinta de la especie a la que se hace referencia. Tales alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de homólogos de especies, en general, y en particular, desplazamientos de genes ortólogos, parálogos o no ortólogos.

40 Un ortólogo es un gen o genes que están relacionados mediante descendencia vertical y 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 hidrólisis de epóxidos. Los genes están relacionados mediante descendencia vertical cuando, por ejemplo, comparten similitud de secuencia de cantidad suficiente como para indicar que son homólogos, o están relacionados mediante evolución a partir de un ancestro común. Los genes también pueden considerarse ortólogos si comparten una estructura tridimensional pero no necesariamente similitud de secuencia, de una cantidad suficiente para indicar que han evolucionado a partir de un ancestro común hasta el grado de que la similitud de secuencia primaria no es identificable. Los genes que son ortólogos pueden codificar para proteínas con una similitud de secuencia de aproximadamente el 25% al 100% de identidad de secuencia de aminoácidos. También puede considerarse que los genes que codifican para proteínas que comparten una similitud de aminoácidos inferior al 25% han surgido mediante descendencia vertical si su estructura tridimensional también muestra similitudes. Se considera que los miembros de la familia de enzimas de serina proteasa, incluyendo el activador de plasminógeno tisular y la elastasa, han surgido mediante descendencia vertical a partir de un ancestro común.

55 Los ortólogos incluyen genes o sus productos génicos codificados que, por ejemplo, mediante evolución, han divergido en cuanto a su estructura o actividad global. Por ejemplo, cuando una especie codifica para un producto génico que muestra dos funciones y cuando tales funciones se han separado en genes diferenciados en una segunda especie, se considera que los tres genes y sus correspondientes productos son ortólogos. Para la producción acoplada con el crecimiento de un producto bioquímico, los expertos en la técnica entenderán que el gen ortólogo que alberga la actividad metabólica que va a alterarse debe elegirse para la construcción del microorganismo que no se produce de manera natural. Un ejemplo de ortólogos que muestran actividades separables es en los que actividades diferenciadas se han separado en productos génicos diferenciados entre dos o más especies o dentro de una única especie. Un ejemplo específico es la separación de la proteólisis de elastasa y la proteólisis de plasminógeno, dos tipos de actividad serina proteasa, en moléculas diferenciadas como activador de plasminógeno y elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de la actividad 5'-3' exonucleasa de micoplasma y ADN polimerasa III de *Drosophila*. La ADN polimerasa de la primera especie puede considerarse un ortólogo de
60
65

cualquiera o ambas de la exonucleasa o la polimerasa de la segunda especie y viceversa.

En cambio, los parálogos son homólogos relacionados, por ejemplo, mediante duplicación seguida por 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 microsomal (epóxido hidrolasa I) y la epóxido hidrolasa soluble (epóxido hidrolasa II) pueden considerarse parálogos porque representan dos enzimas diferenciadas, que evolucionaron conjuntamente de un ancestro común, que catalizan reacciones diferenciadas y tienen funciones diferenciadas en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con similitud de secuencia significativa entre sí que sugiere que son homólogos, o relacionadas mediante evolución conjunta a partir de un ancestro común. Los grupos de familias de proteínas parálogas incluyen homólogos de HipA, genes de luciferasa, peptidasas, y otros.

Un desplazamiento génico no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituir a una función génica a la que se hace referencia en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, poder realizar sustancialmente la misma función o una similar en la especie de origen en comparación con la función a la que se hace referencia en la especie diferente. Aunque generalmente un desplazamiento génico no ortólogo podrá identificarse como estructuralmente relacionado con un gen conocido que codifica para la función a la que se hace referencia, no obstante genes estructuralmente menos relacionados pero funcionalmente similares y sus correspondientes productos génicos todavía entrarán dentro del significado del término tal como se usa en el presente documento. La similitud funcional requiere, por ejemplo, al menos algo de similitud estructural en el sitio activo o la región de unión de un gen no ortólogo en comparación con un gen que codifica para la función que se busca sustituir. Por tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parálogo o un gen no relacionado.

Por tanto, al identificar y construir los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención que tienen capacidad biosintética de 4-HB, GBL y/o BDO, los expertos en la técnica entenderán, al aplicar las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento a una especie particular, que la identificación de modificaciones metabólicas puede incluir la identificación e inclusión o inactivación de ortólogos. En la medida en que están presentes parálogos y/o desplazamientos génicos no ortólogos en el microorganismo al que se hace referencia que codifica para una enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, los expertos en la técnica también pueden usar estos genes relacionados por evolución.

Pueden determinarse ortólogos, parálogos y desplazamientos génicos no ortólogos mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la inspección de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos para dos polipéptidos revelará identidad de secuencia y similitudes entre las secuencias comparadas. Basándose en tales similitudes, un experto en la técnica puede determinar si la similitud es suficientemente alta como para indicar que las proteínas están relacionadas mediante evolución a partir de un ancestro común. Algoritmos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como Align, BLAST, Clustal W y otros, comparan y determinan una identidad o similitud de secuencia en bruto, y también determinan la presencia o significación de huecos en la secuencia a los que se les puede asignar un peso o puntuación. Tales algoritmos también se conocen en la técnica y pueden aplicarse de manera similar para determinar la identidad o similitud de secuencia de nucleótidos. Los parámetros para similitud suficiente para determinar la relación se calculan basándose en métodos bien conocidos para calcular la similitud estadística, o la posibilidad de hallar una coincidencia similar en un polipéptido al azar, y la significación de la coincidencia determinada. Si se desea, los expertos en la técnica también pueden optimizar visualmente una comparación informática de dos o más secuencias. Puede esperarse que las proteínas o los productos génicos relacionados tengan una alta similitud, por ejemplo, identidad de secuencia del 25% al 100%. Las proteínas que no están relacionadas pueden tener una identidad que es esencialmente la misma que la que se esperaría que se produjera por casualidad, si se explora una base de datos de tamaño suficiente (aproximadamente el 5%). Las secuencias de entre el 5% y el 24% pueden representar o no homología suficiente como para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. Pueden llevarse a cabo análisis estadísticos adicionales para determinar la significación de tales coincidencias dado el tamaño del conjunto de datos para determinar la relevancia de estas secuencias.

Pueden establecerse parámetros a modo de ejemplo para determinar la relación de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, de la siguiente manera. En resumen, pueden realizarse alineaciones de secuencias de aminoácidos usando BLASTP versión 2.0.8 (05 de enero de 1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0 BLOSUM62; apertura de hueco: 11; extensión de hueco: 1; x_disminución: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 3; filtro: activado. Pueden realizarse alineaciones de secuencias de ácido nucleico usando BLASTN versión 2.0.6 (16 de septiembre de 1998) y los siguientes parámetros: Coincidencia: 1; coincidencia errónea: -2; apertura de hueco: 5; extensión de hueco: 2; x_disminución: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 11; filtro: desactivado. Los expertos en la técnica sabrán qué modificaciones realizar en los parámetros anteriores para o bien aumentar o bien disminuir la rigurosidad de la comparación, por ejemplo, y determinar la relación de dos o más secuencias.

La descripción proporciona un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural que incluye un organismo microbiano que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxitanoico (4-HB) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxitanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente

de CoA, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, alfa-cetoglutarato descarboxilasa o glutamato descarboxilasa, en el que el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) monomérico. La 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa también se denomina 4-hidroxi-butirato deshidrogenasa o 4-HB deshidrogenasa. La succinil-CoA sintetasa también se denomina succinil-CoA sintasa o succinil-CoA ligasa.

También se proporciona un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural que incluye un organismo microbiano que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA o α -cetoglutarato descarboxilasa, en el que el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) monomérico.

Los biocatalizadores microbianos que no se producen de manera natural de la invención incluyen organismos microbianos que emplean combinaciones de reacciones metabólicas para producir de manera biosintética los compuestos de la invención. Los compuestos biosintetizados pueden producirse de manera intracelular y/o secretarse al medio de cultivo. Los compuestos a modo de ejemplo producidos por los microorganismos que no se producen de manera natural incluyen, por ejemplo, ácido 4-hidroxi-butanoico, 1,4-butanodiol y γ -butirolactona. En la figura 1 se muestran a modo de ejemplo las relaciones de estos compuestos a modo de ejemplo con respecto a la síntesis química o biosíntesis.

Tal como se describe en el presente documento, se diseña mediante ingeniería genética un organismo microbiano que no se produce de manera natural para producir 4-HB. Este compuesto es un punto de entrada útil en la familia de compuestos de 1,4-butanodiol. En las etapas 1-8 de la figura 2 se muestran las reacciones bioquímicas para la formación de 4-HB a partir de succinato, a partir de succinato a través de succinil-CoA o a partir de α -cetoglutarato.

La invención se describe en el presente documento con referencia general a la reacción metabólica, reactivo o producto de la misma, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican para una enzima asociada con, o que cataliza, la reacción metabólica, reactivo o producto al que se hace referencia. A menos que se mencione expresamente lo contrario en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán 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 mencione 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 los genes que codifican para las enzimas que catalizan para la reacción, el reactivo o producto al que se hace referencia. Asimismo, dados los campos bien conocidos de la bioquímica metabólica, la enzimología y la genómica, la referencia en el presente documento a un gen o ácido nucleico codificante también constituye una referencia a la enzima codificante correspondiente y a la reacción que cataliza así como a los reactivos y productos de la reacción.

La producción de 4-HB por medio de modos biosintéticos usando los organismos microbianos de la invención es particularmente útil porque puede producir 4-HB monomérico. Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención y su biosíntesis de 4-HB y la familia de compuestos de BDO también son particularmente útiles porque el producto de 4-HB puede estar carente de cualquier derivatización tal como coenzima A; evita cambios termodinámicos durante la biosíntesis; y permite la biosíntesis directa de BDO.

Generalmente los organismos microbianos carecen de la capacidad para sintetizar 4-HB y, por tanto, se sabe que cualquiera de los compuestos mostrados en la figura 1 están dentro de la familia de compuestos de 1,4-butanodiol o los expertos en la técnica saben que están dentro de la familia de compuestos de 1,4-butanodiol. Además, no se conocen organismos que tengan todas las capacidades enzimáticas metabólicas requeridas para producir 4-HB a partir de las enzimas descritas y las rutas bioquímicas mostradas a modo de ejemplo en el presente documento. En vez de eso, con la posible excepción de algunos microorganismos anaerobios descritos adicionalmente a continuación, los microorganismos que tienen la capacidad enzimática usan 4-HB como sustrato para producir, por ejemplo, succinato. En cambio, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención generan 4-HB como producto. Tal como se describió anteriormente, la biosíntesis de 4-HB en su forma monomérica permite la biosíntesis adicional de compuestos de la familia de BDO y evita completamente procedimientos de síntesis química.

Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención que pueden producir 4-HB se producen garantizando que un organismo microbiano huésped incluye capacidades funcionales para la síntesis bioquímica completa de al menos una ruta biosintética de 4-HB de la invención. Garantizar al menos una ruta biosintética de 4-HB requerida confiere capacidad de biosíntesis de 4-HB al organismo microbiano huésped.

En el presente documento se muestran a modo de ejemplo cinco rutas biosintéticas de 4-HB requeridas y se muestran con fines de ilustración en la figura 2. Una ruta biosintética de 4-HB requerida incluye la biosíntesis de 4-HB a partir de succinato (la ruta de succinato). Las enzimas que participan en esta ruta de 4-HB incluyen semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA y 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa. En esta ruta, la semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA cataliza la reacción inversa a la flecha mostrada

en la figura 2. Otra ruta biosintética de 4-HB requerida incluye la biosíntesis a partir de succinato a través de succinil-CoA (la ruta de succinil-CoA). Las enzimas que participan en esta ruta de 4-HB incluyen succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa. Otras tres rutas biosintéticas de 4-HB requeridas incluyen la biosíntesis de 4-HB a partir de α -cetoglutarato (las rutas de α -cetoglutarato). Por tanto, una tercera ruta biosintética de 4-HB requerida es la biosíntesis de semialdehído succínico a través de glutamato:semialdehído succínico transaminasa, glutamato descarboxilasa y 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa. Una cuarta ruta biosintética de 4-HB requerida que se refiere a la invención también incluye la biosíntesis de 4-HB a partir de α -cetoglutarato, pero usa α -cetoglutarato descarboxilasa para catalizar la síntesis de semialdehído succínico. La 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa cataliza la conversión de semialdehído succínico en 4-HB. Una quinta ruta biosintética de 4-HB requerida incluye la biosíntesis a partir de α -cetoglutarato a través de succinil-CoA y usa α -cetoglutarato deshidrogenasa para producir succinil-CoA, que entra en la ruta de succinil-CoA descrita anteriormente. Cada una de estas rutas biosintéticas de 4-HB, sus sustratos, reactivos y productos, se describen adicionalmente a continuación en los ejemplos.

Los organismos microbianos que no se producen de manera natural tal como se describen en el presente documento pueden producirse introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican para una o más de las enzimas que participan en una o más rutas biosintéticas de 4-HB. Dependiendo del organismo microbiano huésped elegido para la biosíntesis, pueden expresarse ácidos nucleicos para parte o la totalidad de una ruta biosintética de 4-HB particular. Por ejemplo, si un huésped elegido es deficiente en ambas enzimas en la ruta de succinato a 4-HB y se selecciona esta ruta para la biosíntesis de 4-HB, entonces se introducen ácidos nucleicos expresables tanto para semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA como para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa en el huésped para la posterior expresión exógena. Alternativamente, si el huésped elegido muestra semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA endógena, pero es deficiente en 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, entonces se necesita un ácido nucleico codificante para esta enzima para lograr la biosíntesis de 4-HB.

De manera similar, cuando se selecciona que la biosíntesis de 4-HB se produzca a través de la ruta de succinato a succinil-CoA (la ruta de succinil-CoA), deben expresarse de manera endógena en el huésped receptor ácidos nucleicos codificantes para deficiencias en el huésped en las enzimas succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y/o 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa. La selección de la biosíntesis de 4-HB a través de la ruta de α -cetoglutarato a semialdehído succínico (la ruta de α -cetoglutarato) puede usar la expresión exógena para deficiencias en el huésped en una o más de las enzimas para glutamato:semialdehído succínico transaminasa, glutamato descarboxilasa y/o 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, o α -cetoglutarato descarboxilasa y 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa.

Dependiendo de los constituyentes de la ruta biosintética de 4-HB de un organismo microbiano huésped seleccionado, el biocatalizador de 4-HB microbiano que no se produce de manera natural descrito en el presente documento incluirá al menos un ácido nucleico codificante de la ruta de 4-HB expresado de manera exógena y hasta todos los ácidos nucleicos codificantes para una o más rutas biosintéticas de 4-HB. Por ejemplo, puede establecerse la biosíntesis de 4-HB a partir de las cinco rutas en un huésped deficiente en 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa a través de la expresión exógena de un ácido nucleico codificante para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa. En cambio, puede establecerse la biosíntesis de 4-HB a partir de las cinco rutas en un huésped deficiente en las ocho enzimas a través de expresión exógena de las ocho de semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, glutamato descarboxilasa, α -cetoglutarato descarboxilasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa.

Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que el número de ácidos nucleicos codificantes que deben introducirse en una forma expresable será, al menos, paralelo a las deficiencias en la ruta de 4-HB del organismo microbiano huésped seleccionado. Por tanto, un organismo microbiano que no se produce de manera natural descrito en el presente documento puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho ácidos nucleicos que codifican para las enzimas anteriores que constituyen una o más rutas biosintéticas de 4-HB. En algunas realizaciones, los organismos microbianos que no se producen de manera natural también pueden incluir otras modificaciones genéticas que facilitan u optimizan la biosíntesis de 4-HB o que confieren otras funciones útiles al organismo microbiano huésped. Una de tal otra funcionalidad puede incluir, por ejemplo, aumento de la síntesis de uno o más de los precursores de la ruta de 4-HB tales como succinato, succinil-CoA y/o α -cetoglutarato.

En algunas realizaciones, se genera un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la invención a partir de un huésped que contiene la capacidad enzimática para sintetizar 4-HB. En esta realización específica puede ser útil aumentar la síntesis o acumulación de un producto de la ruta de 4-HB para, por ejemplo, impulsar las reacciones de la ruta de 4-HB hacia la producción de 4-HB. Puede lograrse el aumento de la síntesis o la acumulación, por ejemplo, mediante sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifican para una o más de las enzimas de ruta de 4-HB descritas anteriormente. La sobreexpresión de la enzima o enzimas de la ruta de 4-HB puede producirse, por ejemplo, a través de expresión exógena del gen o los genes endógenos, o a través de

expresión exógena del gen o los genes heterólogos. Por tanto, pueden generarse fácilmente organismos que se producen de manera natural para que sean organismos microbianos que producen 4-HB de manera no natural de la invención a través de la sobreexpresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco o los seis ácidos nucleicos que codifican para enzimas de la ruta biosintética de 4-HB. Además, puede generarse un organismo que no se produce de manera natural mediante mutagénesis de un gen endógeno que da como resultado un aumento de la actividad de una enzima en la ruta biosintética de 4-HB.

En realizaciones particularmente útiles, se emplea la expresión exógena de los ácidos nucleicos codificantes. La expresión exógena confiere la capacidad de diseñar a medida la expresión y/o los elementos reguladores en el huésped y la aplicación para lograr un nivel de expresión deseado que se controla por el usuario. Sin embargo, también puede usarse la expresión endógena en otras realizaciones tales como eliminando un efector regulador negativo o induciendo el promotor del gen cuando está asociado con un promotor inducible u otro elemento regulador. Por tanto, puede regularse por incremento un gen endógeno que tiene un promotor inducible que se produce de manera natural proporcionando el agente inductor apropiado, o puede modificarse por ingeniería genética la región reguladora de un gen endógeno para incorporar un elemento regulador inducible, permitiendo de ese modo la regulación de la expresión aumentada de un gen endógeno en un momento deseado. De manera similar, puede incluirse un promotor inducible como elemento regulador para un gen exógeno introducido en un organismo microbiano que no se produce de manera natural (véanse los ejemplos II y IV, por ejemplo).

Se pretende que “exógeno”, tal como se usa en el presente documento, signifique que la molécula a la que se hace referencia o la actividad a la que se hace referencia se introduce en el organismo microbiano huésped incluyendo, por ejemplo, la introducción de un ácido nucleico codificante en el material genético del huésped tal como mediante integración en un cromosoma del huésped. Por tanto, el término tal como se usa con referencia a expresión de un ácido nucleico codificante se refiere a la introducción del ácido nucleico codificante en una forma expresable en el organismo microbiano. Cuando se usa con referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo de referencia huésped. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico codificante homólogo o heterólogo que expresa la actividad a la que se hace referencia tras la introducción en el organismo microbiano huésped. Por tanto, el término “endógeno” se refiere a una molécula o actividad a la que se hace referencia que está presente en el huésped. De manera similar, el término, cuando se usa con referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenido dentro del organismo microbiano. El término “heterólogo” se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente distinta de la especie a la que se hace referencia, 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 usar cualquiera o ambos de un ácido nucleico codificante heterólogo u homólogo.

Las fuentes de ácidos nucleicos codificantes para una enzima de la ruta de 4-HB pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie en la que el producto génico codificado puede catalizar la reacción a la que se hace referencia. Tales especies incluyen organismos tanto procariotas como eucariotas incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias, incluyendo arqueas y eubacterias, y eucariotas, incluyendo levadura, planta, insecto, animal y mamífero, incluyendo ser humano. Las especies a modo de ejemplo para tales fuentes incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Ralstonia eutropha*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Porphyromonas gingivalis*. Por ejemplo, los organismos microbianos que tienen producción biosintética de 4-HB se muestran a modo de ejemplo en el presente documento con referencia a huéspedes de levadura y *E. coli*. Sin embargo, con la secuencia genómica completa disponible ahora para más de 550 especies (estando más de la mitad de éstas disponibles en bases de datos públicas tales como el NCBI), incluyendo genomas de 395 microorganismos y una variedad de genomas de levaduras, hongos, plantas y mamíferos, la identificación de genes que codifican para la actividad biosintética de 4-HB requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, incluyendo por ejemplo, homólogos, ortólogos, parálogos y desplazamientos génicos no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos resulta rutinario y se conoce bien en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de 4-HB y otros compuestos de la invención descritos en el presente documento con referencia a un organismo particular tal como *E. coli* o levadura pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas por igual. Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica mostrada a modo de ejemplo en un organismo puede aplicarse igualmente a otros organismos.

En algunos casos, tales como cuando existe una ruta biosintética de 4-HB alternativa en una especie no relacionada, puede conferirse biosíntesis de 4-HB a la especie huésped, por ejemplo, mediante expresión exógena de un parólogo o parálogos de la especie no relacionada que catalizan una reacción metabólica similar, pero no idéntica, para sustituir a la reacción a la que se hace referencia. Dado que existen ciertas diferencias entre las redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la técnica entenderán que el uso de genes real entre diferentes organismos puede diferir. Sin embargo, dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica también entenderán que las enseñanzas y los métodos de la invención pueden aplicarse a todos los organismos microbianos usando las alteraciones metabólicas relacionadas con las mostradas a modo de ejemplo en el presente documento para construir un organismo microbiano en una especie de

interés que sintetizará 4-HB monomérico.

Pueden seleccionarse organismos microbianos huésped, y generarse los organismos microbianos que no se producen de manera natural, por ejemplo, de bacterias, levadura, hongo o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a procedimientos de fermentación. Las bacterias a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *E. 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*. Las levaduras u hongos a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Pichia pastoris*.

Pueden realizarse métodos para construir y someter a prueba los niveles de expresión de un huésped productor de 4-HB que no se produce de manera natural, por ejemplo, mediante métodos recombinantes y de detección bien conocidos en la técnica. Tales métodos pueden encontrarse descritos, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999). Pueden separarse 4-HB y GBL, por ejemplo, mediante HPLC usando una columna Spherisorb 5 ODS1 y una fase móvil del 70% de tampón fosfato 10 mM (pH=7) y el 30% de metanol, y detectarse usando un detector UV a 215 nm (Hennessey *et al.* 2004, J. Forensic Sci. 46(6):1-9). BDO se detecta mediante cromatografía de gases o mediante HPLC y detector de índice de refracción usando una columna Aminex HPX-87H y una fase móvil de ácido sulfúrico 0,5 mM (Gonzalez-Pajuelo *et al.*, Met. Eng. 7:329-336 (2005)).

Por ejemplo, puede construirse un vector o vectores de expresión para albergar una o más rutas biosintéticas de 4-HB y/o uno o más ácidos nucleicos codificantes biosintéticos para BDO tal como se muestra a modo de ejemplo en el presente documento unidos operativamente a secuencias de control de la 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 de fago, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, incluyendo vectores y secuencias de selección o marcadores operables para la integración estable en un cromosoma huésped. También pueden incluirse genes de marcadores seleccionables que, por ejemplo, proporcionan resistencia 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, y similares que se conocen bien en la técnica. Cuando deben expresarse conjuntamente dos o más ácidos nucleicos codificantes exógenos, pueden insertarse ambos ácidos nucleicos, por ejemplo, en un vector de expresión individual o en vectores de expresión separados. Para el vector expresión individual, los ácidos nucleicos codificantes pueden unirse operacionalmente a una secuencia de control de la expresión común o unirse a diferentes secuencias de control de la expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ácido nucleico exógenas implicadas en una ruta metabólica o sintética puede confirmarse usando métodos bien conocidos en la técnica.

Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención se construyen usando métodos bien conocidos en la técnica tal como se mostró a modo de ejemplo anteriormente para expresar de manera exógena al menos un ácido nucleico que codifica para una enzima de la ruta de 4-HB en cantidades suficientes para producir 4-HB monomérico. A continuación en los ejemplos se describen adicionalmente niveles de expresión a modo de ejemplo para enzimas de 4-HB en cada ruta. Siguiendo las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención pueden lograr la biosíntesis de 4-HB monomérico dando como resultado concentraciones intracelulares de entre aproximadamente 0,1-25 mM o más. Generalmente, la concentración intracelular de 4-HB monomérico es de entre aproximadamente 3-20 mM, particularmente entre aproximadamente 5-15 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-12 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM o más. También pueden lograrse concentraciones intracelulares entre y por encima de cada uno de estos intervalos a modo de ejemplo a partir de los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención.

Tal como se describe adicionalmente a continuación, una condición de crecimiento a modo de ejemplo para lograr la biosíntesis de 4-HB incluye condiciones de cultivo o fermentación anaerobias. En determinadas realizaciones, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención pueden sustentarse, cultivarse o fermentarse en condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias. En resumen, las condiciones anaerobias se refieren a un entorno carente de oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaerobias incluyen, por ejemplo, un cultivo, fermentación discontinua o fermentación continua de tal manera que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanece entre el 0 y el 10% de la saturación. Las condiciones sustancialmente anaerobias también incluyen células en crecimiento o en reposo en medio líquido o en agar sólido dentro de una cámara sellada mantenida con una atmósfera con menos del 1% de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede mantenerse, por ejemplo, burbujeando el cultivo con una mezcla de N₂/CO₂ u otro gas o gases distintos de oxígeno adecuados.

La descripción también proporciona un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural que incluye un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO)

que incluyen al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, glutamato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa independiente de CoA, aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA o alcohol deshidrogenasa, en el que el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir 1,4-butanodiol (BDO). La 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa también se conoce como 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa.

La descripción proporciona además un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural que incluye un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO), las rutas incluyen al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa, 4-butirato cinasa, fosfotransbutirilasa, α -cetoglutarato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o una aldehído/alcohol deshidrogenasa, en el que el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir 1,4-butanodiol (BDO).

También pueden generarse organismos microbianos que no se producen de manera natural que biosintetizan BDO. Como con los organismos microbianos productores de 4-HB descritos en el presente documento, los organismos microbianos productores de BDO de la invención también pueden producir de manera intracelular o secretar el BDO al medio de cultivo. Siguiendo las enseñanzas y directrices proporcionadas anteriormente para la construcción de organismos microbianos que sintetizan 4-HB, pueden incorporarse rutas de BDO adicionales en los organismos microbianos productores de 4-HB para generar organismos que también sintetizan BDO y otros compuestos de la familia de BDO. En la figura 1 se ilustra la síntesis química de BDO y sus productos posteriores. Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención que pueden biosintetizar BDO sortean estas síntesis químicas usando 4-HB como punto de entrada tal como se ilustra en la figura 2. Tal como se describe adicionalmente a continuación, los productores de 4-HB también pueden usarse para convertir químicamente 4-HB en GBL y después en BDO o THF, por ejemplo. Según la invención, los productores de 4-HB se modifican adicionalmente para incluir capacidades biosintéticas para la conversión de 4-HB y/o GBL en BDO.

Las rutas de BDO adicionales para introducir en productores de 4-HB incluyen, por ejemplo, la expresión exógena en un contexto genético deficiente huésped o la sobreexpresión de una o más de las enzimas mostradas a modo de ejemplo en la figura 2 como las etapas 9-13. Una ruta de este tipo incluye, por ejemplo, las actividades enzimáticas necesarias para llevar a cabo las reacciones mostradas como las etapas 9, 12 y 13 en la figura 2, en las que las aldehído y alcohol deshidrogenasas pueden ser enzimas separadas o una enzima multifuncional que tiene actividad tanto aldehído como alcohol deshidrogenasa. Otra ruta de este tipo incluye, por ejemplo, las actividades enzimáticas necesarias para llevar a cabo las reacciones mostradas como las etapas 10, 11, 12 y 13 en la figura 2, también en las que las aldehído y alcohol deshidrogenasas pueden ser enzimas separadas o una enzima multifuncional que tiene actividad tanto aldehído como alcohol deshidrogenasa. Por consiguiente, las rutas de BDO adicionales para introducir en productores de 4-HB incluyen, por ejemplo, la expresión exógena en un contexto genético deficiente huésped o la sobreexpresión de una o más de a 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa, butirato cinasa, fosfotransbutirilasa, aldehído deshidrogenasa independiente de CoA, aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA o una alcohol deshidrogenasa. En ausencia de acil-CoA sintetasa endógena que pueda modificar 4-HB, los organismos microbianos productores de BDO que no se producen de manera natural pueden incluir además una acil-CoA sintetasa exógena selectiva para 4-HB, o la combinación de múltiples enzimas que tienen como reacción neta la conversión de 4-HB en 4-HB-CoA. Tal como se muestra a modo de ejemplo adicionalmente a continuación en los ejemplos, butirato cinasa y fosfotransbutirilasa muestran actividad de la ruta de BDO y catalizan las conversiones ilustradas en la figura 2 con un sustrato de 4-HB. Por tanto, estas enzimas también pueden denominarse en el presente documento 4-hidroxi-butirato cinasa y fosfotranshidroxibutirilasa, respectivamente.

En la tabla 1 a continuación se enumeran alcohol y aldehído deshidrogenasas a modo de ejemplo que pueden usarse para estas conversiones *in vivo* de 4-HB en BDO.

Tabla 1. Alcohol y aldehído deshidrogenasas para la conversión de 4-HB en BDO.

ALCOHOL DESHIDROGENASAS	ec: 1.1.1.78 metilgloxal reductasa (dependiente de NADH)
ec: 1.1.1.1 alcohol deshidrogenasa	ec: 1.1.1.79 glioxilato reductasa (NADP+)
ec: 1.1.1.2 alcohol deshidrogenasa (NADP+)	ec: 1.1.1.80 isopropanol deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.1.1.4 (R,R)-butanodiol deshidrogenasa	ec: 1.1.1.81 hidroxipiruvato reductasa
ec: 1.1.1.5 acetoína deshidrogenasa	ec: 1.1.1.82 malato deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.1.1.6 glicerol deshidrogenasa	ec: 1.1.1.83 D-malato deshidrogenasa (descarboxilante)
ec: 1.1.1.7 propanodiol-fosfato deshidrogenasa	ec: 1.1.1.84 dimetilmalato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.8 glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD+)	ec: 1.1.1.85 3-isopropilmalato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.11 D-arabinitol 4-deshidrogenasa	ec: 1.1.1.86 cetol-ácido reductoisomerasa
ec: 1.1.1.12 L-arabinitol 4-deshidrogenasa	ec: 1.1.1.87 homoisocitrato deshidrogenasa

- ec: 1.1.1.13 L-arabinitol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.14 L-iditol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.15 D-iditol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.16 galactitol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.17 manitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa
- ec: 1.1.1.18 inositol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.21 aldehído reductasa
 ec: 1.1.1.23 histidinol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.26 glioxilato reductasa
 ec: 1.1.1.27 L-lactato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.28 D-lactato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.29 glicerato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.30 3-hidroxiobutirato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.31 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.35 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.36 acetoacetil-CoA reductasa
 ec: 1.1.1.37 malato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.38 malato deshidrogenasa (oxaloacetato-des-carboxilante)
 ec: 1.1.1.39 malato deshidrogenasa (des-carboxilante)
 ec: 1.1.1.40 malato deshidrogenasa (oxaloacetato-des-carboxilante) (NADP+)
 ec: 1.1.1.41 isocitrato deshidrogenasa (NAD+)
 ec: 1.1.1.42 isocitrato deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.54 alil-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.55 lactaldehído reductasa (NADPH)
 ec: 1.1.1.56 ribitol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.59 3-hidroxiopropionato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.60 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa
- ec: 1.1.1.61 4-hidroxiobutirato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.66 omega-hidroxi-decanoato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.67 manitol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.71 alcohol deshidrogenasa [NAD(P)+]
 ec: 1.1.1.72 glicerol deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.73 octanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.75 (R)-aminopropanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.76 (S,S)-butanodiol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.77 lactaldehído reductasa
- ec: 1.1.1.178 3-hidroxi-2-metilbutiril-CoA deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.185 L-glicol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.190 indol-3-acetaldehído reductasa (NADH)
 ec: 1.1.1.191 indol-3-acetaldehído reductasa (NADPH)
- ec: 1.1.1.192 alcohol de cadena larga deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.194 coniferil-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.195 cinamil-alcohol deshidrogenasa
- ec: 1.1.1.198 (+)-borneol deshidrogenasa
- ec: 1.1.1.202 1,3-propanodiol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.207 (-)-mentol deshidrogenasa
- ec: 1.1.1.208 (+)-neomentol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.216 farnesol deshidrogenasa
- ec: 1.1.1.217 bencil-2-metil-hidroxiobutirato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.222 (R)-4-hidroxifenilactato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.223 isopiperitenol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.226 4-hidroxiciclohexanocarboxilato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.229 2-metil-3-oxosuccinato de dietilo
- ec: 1.1.1.88 hidroximetilglutaril-CoA reductasa
 ec: 1.1.1.90 aril-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.91 aril-alcohol deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.92 oxaloglicolato reductasa (des-carboxilante)
 ec: 1.1.1.94 glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD(P)+]
 ec: 1.1.1.95 fosfoglicerato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.97 3-hidroxi-bencil-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.101 acilglicerona-fosfato reductasa
 ec: 1.1.1.103 L-treonina 3-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.104 4-oxoprolina reductasa
 ec: 1.1.1.105 retinol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.110 indol-lactato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.112 indanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.113 L-xilosa 1-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.129 L-treonato 3-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.137 ribitol-5-fosfato 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.138 manitol 2-deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.140 sorbitol-6-fosfato 2-deshidrogenasa
- ec: 1.1.1.142 D-pinitol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.143 secuoyitol deshidrogenasa
- ec: 1.1.1.144 perill-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.156 glicerol 2-deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.157 3-hidroxi-butilil-CoA deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.163 ciclopentanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.164 hexadecanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.165 2-alquin-1-ol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.166 hidroxiciclohexanocarboxilato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.167 hidroximalonato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.174 ciclohexano-1,2-diol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.177 glicerol-3-fosfato 1-deshidrogenasa (NADP+)
- ec: 1.2.1.5 aldehído deshidrogenasa [NAD(P)+]
 ec: 1.2.1.7 benzaldehído deshidrogenasa [NAD(P)+]
 ec: 1.2.1.8 betaína-aldehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.9 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.2.1.10 acetaldehído deshidrogenasa (acetilante)
 ec: 1.2.1.11 aspartato-semialdehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.12 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (fosforilante)
 ec: 1.2.1.13 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+) (fosforilante)
 ec: 1.2.1.15 malonato-semialdehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.16 succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(P)+]
 ec: 1.2.1.17 glioxilato deshidrogenasa (acilante)
 ec: 1.2.1.18 malonato-semialdehído deshidrogenasa (acetilante)
 ec: 1.2.1.19 aminobutiraldehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.20 glutarato-semialdehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.21 glicolaldehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.22 lactaldehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.23 2-oxoaldehído deshidrogenasa (NAD+)

reductasa

ec: 1.1.1.237 hidroxifenilpiruvato reductasa
ec: 1.1.1.244 metanol deshidrogenasa

ec: 1.1.1.245 ciclohexanol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.250 D-arabinitol 2-deshidrogenasa

ec: 1.1.1.251 galactitol 1-fosfato 5-deshidrogenasa
ec: 1.1.1.255 manitol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.256 fluoren-9-ol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.257 4-(hidroximetil)bencenosulfonato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.258 6-hidroxihexanoato deshidrogenasa

ec: 1.1.1.259 3-hidroxipimeloil-CoA deshidrogenasa
ec: 1.1.1.261 glicerol-1-fosfato deshidrogenasa [NAD(P)+]
ec: 1.1.1.265 3-metilbutanal reductasa
ec: 1.1.1.283 metilglicoxal reductasa (dependiente de NADPH)
ec: 1.1.1.286 isocitrato-homoisocitrato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.287 D-arabinitol deshidrogenasa (NADP+) butanol deshidrogenasa

ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

ec: 1.2.1.2 formiato deshidrogenasa
ec: 1.2.1.3 aldehído deshidrogenasa (NAD+)
ec: 1.2.1.4 aldehído deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.2.1.45 4-carboxi-2-hidroxiuconato-6-semialdehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.46 formaldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.47 4-trimetilamoniobutiraldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.48 aldehído de cadena larga deshidrogenasa
ec: 1.2.1.49 2-oxoaldehído deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.2.1.51 piruvato deshidrogenasa (NADP+)

ec: 1.2.1.52 oxoglutarato deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.2.1.53 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.57 butanal deshidrogenasa
ec: 1.2.1.58 fenilglicoxilato deshidrogenasa (acilante)

ec: 1.2.1.24 succinato-semialdehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.25 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (acilante)
ec: 1.2.1.26 2,5-dioxovalerato deshidrogenasa
ec: 1.2.1.27 metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa (acilante)
ec: 1.2.1.28 benzaldehído deshidrogenasa (NAD+)
ec: 1.2.1.29 aril-aldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.30 aril-aldehído deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.2.1.31 L-aminoadipato-semialdehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.32 aminomuconato-semialdehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.36 retinal deshidrogenasa
ec: 1.2.1.39 fenilacetaldehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.41 glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.42 hexadecanal deshidrogenasa (acilante)
ec: 1.2.1.43 formiato deshidrogenasa (NADP+)

ec: 1.2.1.59 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NAD(P)+) (fosforilante)
ec: 1.2.1.62 4-formilbencenosulfonato deshidrogenasa
ec: 1.2.1.63 6-oxohexanoato deshidrogenasa
ec: 1.2.1.64 4-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.65 salicilaldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.66 formaldehído deshidrogenasa dependiente de micotiol
ec: 1.2.1.67 vanilina deshidrogenasa
ec: 1.2.1.68 coniferil-aldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.69 fluoroacetaldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.71 succinilglutamato-semialdehído deshidrogenasa

5 También pueden emplearse rutas distintas de las mostradas a modo de ejemplo anteriormente para generar la biosíntesis de BDO en organismos microbianos que no se producen de manera natural. En una realización, puede lograrse la biosíntesis usando una ruta de L-homoserina a BDO. Esta ruta tiene un rendimiento molar de 0,90 mol/mol de glucosa, que parece limitado por la disponibilidad de equivalentes reductores. Una segunda ruta sintetiza BDO a partir de acetoacetato y puede lograr un rendimiento teórico máximo de 1,091 mol/mol de glucosa. Puede lograrse la implementación de cualquier ruta mediante la introducción de dos enzimas exógenas, y ambas rutas pueden complementar adicionalmente la producción de BDO por medio de succinil-CoA. A continuación se describen adicionalmente las enzimas, termodinámica, rendimientos teóricos y viabilidad global de las rutas.

10 También puede diseñarse por ingeniería genética una ruta de homoserina para generar organismos microbianos productores de BDO. La homoserina es un producto intermedio en el metabolismo de treonina y metionina, formada a partir de oxaloacetato por medio de aspartato. La conversión de oxaloacetato en homoserina requiere un NADH, dos NADPH y un ATP (figura 3). Una vez formada, se alimenta la homoserina a rutas biosintéticas tanto para treonina como para metionina. En la mayoría de los organismos, altos niveles de treonina o metionina se retroalimentan para reprimir la ruta de biosíntesis de homoserina (Caspi *et al.*, Nucleic Acids Res. 34: D511-D516 (1990)).

20 La transformación de homoserina en 4-hidroxibutirato (4-HB) puede lograrse en dos etapas enzimáticas tal como se muestra en la figura 4. La primera etapa de esta ruta es la desaminación de homoserina mediante una supuesta amoniaco liasa. Esta reacción tiene una barrera termodinámica estimada de 12 kJ/mol, pero probablemente puede impulsarse en sentido directo mediante un gradiente de concentración. En la etapa 2, se reduce el producto alqueno, 4-hidroxibut-2-enoato, para dar 4-HB mediante una supuesta reductasa a costa de un NADH. Esta etapa de reacción es altamente favorable desde el punto de vista termodinámico en el sentido de la síntesis de 4-HB, con una $\Delta_{rxn}G$ estimada de -59 kJ/mol. Entonces puede convertirse 4-HB en BDO como en la figura 2 anterior.

En la figura 5 se muestran enzimas disponibles para catalizar las transformaciones anteriores. Por ejemplo, la amoniaco liasa en la etapa 1 de la ruta se parece estrechamente a la química de aspartato amoniaco liasa (aspartasa). La aspartasa es una enzima generalizada en microorganismos, y se ha caracterizado extensamente (Viola, R.E., Mol. Biol. 74:295-341 (2008)). La estructura cristalina de la aspartasa de *E. coli* se ha resuelto (Shi *et al.*, Biochemistry 36:9136-9144 (1997)), por tanto es posible diseñar directamente por ingeniería genética mutaciones en el sitio activo de la enzima que alterarán su especificidad de sustrato para incluir homoserina. La oxidorreductasa en la etapa 2 tiene una química similar a varias enzimas bien caracterizadas incluyendo fumarato reductasa en el ciclo de TCA de *E. coli*. Dado que la termodinámica de esta reacción es altamente favorable, es probable que una reductasa endógena con una amplia especificidad de sustrato pueda reducir 4-hidroxibut-2-enoato. El rendimiento de esta ruta en condiciones anaerobias es de 0,9 mol de BDO por mol de glucosa aunque, en comparación con la ruta en la figura 2 (1,09 mol/mol de glucosa), ambas rutas parecen tener requisitos energéticos y reductores similares a partir del precursor metabólico oxaloacetato (figura 6).

Se encontró que la ruta de succinil-CoA tenía un rendimiento superior debido al hecho de que es energéticamente más eficaz. La conversión de una molécula de oxaloacetato en BDO por medio de la ruta de homoserina requerirá el gasto de 2 equivalentes de ATP. Dado que la conversión de glucosa en dos moléculas de oxaloacetato puede generar un máximo de 3 moléculas de ATP suponiendo que la PEP carboxinasa es reversible, la conversión global de glucosa en BDO por medio de homoserina tiene un rendimiento energético negativo. Tal como se esperaba, si se supone que puede generarse energía mediante la respiración, el rendimiento máximo de la ruta de homoserina aumenta hasta 1,05 mol/mol de glucosa, lo cual es el 96% del rendimiento de la ruta de succinil-CoA. La ruta de succinil-CoA puede canalizar parte del flujo de carbono a través de piruvato deshidrogenasa y la rama oxidativa del ciclo de TCA para generar tanto equivalentes reductores como succinil-CoA sin un gasto energético. Por tanto, no encuentra las mismas dificultades energéticas que la ruta de homoserina porque no se canaliza todo el flujo a través de oxaloacetato para dar succinil-CoA para dar BDO. En conjunto, la ruta de homoserina demuestra una ruta de rendimiento moderadamente alto para dar BDO. Una característica particularmente útil es que implica un diseño por ingeniería genética mínimo, con sólo dos etapas no nativas. Es probable que la ruta sea termodinámicamente favorable en el sentido de la síntesis de BDO.

También puede diseñarse por ingeniería genética una ruta de acetoacetato para generar organismos microbianos productores de BDO. En *E. coli* se produce acetoacetato a partir de la degradación de acetona y leucina. También puede formarse acetoacetato a partir de acetil-CoA mediante enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, incluyendo acetil-CoA acetiltransferasa y acetoacetil-CoA transferasa (figura 7). Las rutas biosintéticas a través de acetoacetato también son particularmente útiles en organismos microbianos que pueden metabolizar compuestos de carbono individuales para formar acetil-CoA.

Puede usarse una ruta de tres etapas a partir de acetoacetato para dar semialdehído succínico (figura 8) para sintetizar BDO a través de acetoacetato. Puede convertirse semialdehído succínico, que está separado por una etapa de reducción de succinil-CoA o separado por una etapa de descarboxilación de α -cetoglutarato, en BDO siguiendo tres etapas de reducción (figura 2). En resumen, la etapa 1 de la biorruta de acetoacetato conlleva la conversión de acetoacetato en 3-aminobutanoato mediante una ω -aminotransferasa. Se sobreexpresó la ω -aminoácido:piruvato aminotransferasa (ω -APT) de *Alcaligenes denitrificans* en *E. coli* y se mostró que tenía una alta actividad hacia 3-aminobutanoato *in vitro* (Yun *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 70:2529-2534 (2004)). En este estudio no se midió la actividad de ω -APT en el sentido requerido en este caso, debido a la descomposición espontánea de acetoacetato para dar acetona en la mezcla de reacción. Sin embargo, la termodinámica indica que es viable.

En la etapa 2, una supuesta aminomutasa desplaza el grupo amina de la posición 3 a la 4 del esqueleto de carbono. No se ha caracterizado una aminomutasa que realiza esta función sobre 3-aminobutanoato, pero una enzima de *Clostridium sticklandii* tiene un mecanismo muy similar (figura 9). La enzima, D-lisina-5,6-aminomutasa, está implicada en la biosíntesis de lisina.

La ruta sintética para dar BDO a partir de acetoacetato pasa a través de 4-aminobutanoato, un metabolito en *E. coli* que se forma normalmente a partir de la descarboxilación de glutamato. Una vez formado, puede convertirse 4-aminobutanoato en semialdehído succínico mediante 4-aminobutanoato transaminasa (2.6.1.19), una enzima que se ha caracterizado bioquímicamente. La termodinámica de esta enzima y otras etapas de la ruta está próxima al equilibrio, de modo que es probable que el funcionamiento de enzimas en el sentido de interés se impulse mediante concentraciones de sustrato y producto

Una consideración para seleccionar enzimas candidatas en esta ruta es la estereoselectividad de las enzimas implicadas en las dos primeras etapas. La ω -ABT en *Alcaligenes denitrificans* es específica para el estereoisómero L de 3-aminobutanoato, mientras que D-lisina-5,6-aminomutasa requiere probablemente el estereoisómero D. Si no pueden encontrarse o diseñarse por ingeniería genética enzimas con estereoselectividad complementaria, será necesario añadir una tercera enzima a la ruta con actividad racemasa que puede convertir L-3-aminobutanoato en D-3-aminobutanoato. Aunque las aminoácido racemasas están generalizadas, se desconoce si estas enzimas pueden funcionar con ω -aminoácidos.

El rendimiento molar teórico máximo de esta ruta en condiciones anaerobias es de 1,091 mol/mol de glucosa. Con el fin de generar flujo a partir de acetoacetato para dar BDO era necesario suponer que la acetil-CoA:acetoacetil-CoA transferasa (enzima 3 en la figura 10) es reversible. La función de esta enzima en *E. coli* es metabolizar ácidos grasos de cadena corta convirtiéndolos en primer lugar en tioésteres.

Aunque no se ha demostrado experimentalmente el funcionamiento de acetil-CoA:acetoacetil-CoA transferasa en el sentido de consumo de acetato en *E. coli*, estudios con enzimas similares en otros organismos respaldan la suposición de que esta reacción es reversible. La enzima butiril-CoA:acetato:CoA transferasa en los microbios intestinales *Roseburia* sp. y *F. prasnitzii* funciona en el sentido de uso de acetato para producir butirato (Duncan *et al.*, Appl. Environ. Microbiol 68:5186-5190 (2002)). Otra enzima muy similar, acetil:succinato CoA-transferasa en *Trypanosoma brucei*, también funciona en el sentido de uso de acetato. Esta reacción tiene una $\Delta_{rxn}G$ próxima al equilibrio, de modo que es probable que altas concentraciones de acetato puedan impulsar la reacción en el sentido de interés. A la tasa de producción de BDO teórica máxima de 1,09 mol/mol de glucosa, las simulaciones predicen que *E. coli* puede generar 1,098 mol de ATP por mol de glucosa sin subproductos de fermentación. Este rendimiento de ATP debe ser suficiente para el crecimiento celular, el mantenimiento y la producción. La biorruta de acetoacetato es una ruta de alto rendimiento para dar BDO a partir de acetil-CoA. Como la ruta de homoserina, esta ruta requiere una mínima modificación por ingeniería genética de la cepa, con tan sólo dos etapas no nativas además de la ruta de BDO.

Por tanto, además de cualquiera de las diversas modificaciones mostradas a modo de ejemplo anteriormente para establecer la biosíntesis de 4-HB en un huésped seleccionado, los organismos microbianos productores de BDO pueden incluir cualquiera de las combinaciones y permutaciones anteriores de modificaciones metabólicas de la ruta de 4-HB así como cualquier combinación de expresión para aldehído deshidrogenasa independiente de CoA, aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA o una alcohol deshidrogenasa para generar rutas biosintéticas para GBL y/o BDO. Por tanto, los productores de BDO descritos en el presente documento pueden tener expresión exógena, por ejemplo, de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o las 10 enzimas correspondientes a cualquiera de las seis enzimas de la ruta de 4-HB y/o cualquiera de las 4 de la ruta de BDO.

El diseño y la construcción de organismos microbianos modificados genéticamente se lleva a cabo usando métodos bien conocidos en la técnica para lograr cantidades suficientes de expresión para producir BDO. En particular, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención pueden lograr la biosíntesis de BDO dando como resultado concentraciones intracelulares de entre aproximadamente 0,1-25 mM o más. Generalmente, la concentración intracelular de BDO es de entre aproximadamente 3-20 mM, particularmente entre aproximadamente 5-15 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-12 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM o más. También pueden lograrse concentraciones intracelulares entre y por encima de cada uno de estos intervalos a modo de ejemplo a partir de los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención. Como con los productores de 4-HB, los productores de BDO también pueden sustentarse, cultivarse o fermentarse en condiciones anaerobias.

La descripción proporciona además un método para la producción de 4-HB. El método incluye cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxitbutanoico (4-HB) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxitbutanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, α -cetoglutarato descarboxilasa o glutamato descarboxilasa en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir ácido 4-hidroxitbutanoico monomérico (4-HB). El método puede incluir adicionalmente la conversión química de 4-HB en GBL y en BDO o THF, por ejemplo.

Se proporciona adicionalmente un método para la producción de 4-HB. El método incluye cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxitbutanoico (4-HB) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxitbutanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA o α -cetoglutarato descarboxilasa en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir ácido 4-hidroxitbutanoico monomérico (4-HB). El producto de 4-HB puede secretarse al medio de cultivo.

Además se proporciona un método para la producción de BDO. El método incluye cultivar un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxitbutanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO), incluyendo las rutas al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxitbutanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxitbutirato:CoA transferasa, 4-hidroxitbutirato cinasa, fosfotranshidroxibutirilasa, α -cetoglutarato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o una aldehído/alcohol deshidrogenasa durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO). El producto de BDO puede secretarse al medio de cultivo.

Se entiende que, en métodos de la invención, cualquiera del uno o más ácidos nucleicos exógenos puede

introducirse en un organismo microbiano para producir un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la invención. Los ácidos nucleicos pueden introducirse para conferir, por ejemplo, una ruta biosintética de 4-HB, BDO, THF o GBL en el organismo microbiano. Alternativamente, pueden introducirse ácidos nucleicos codificantes para producir un organismo microbiano intermedio que tiene la capacidad biosintética para catalizar algunas de las reacciones requeridas para conferir capacidad biosintética de 4-HB, BDO, THF o GBL. Por ejemplo, un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta biosintética de 4-HB puede comprender al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican para enzimas deseadas, tales como la combinación de 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y α -cetoglutarato descarboxilasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA; semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y succinil-CoA sintetasa; succinil-CoA sintetasa y glutamato descarboxilasa, y similares. Por tanto, se entiende que puede incluirse cualquier combinación de dos o más enzimas de una ruta biosintética en un organismo microbiano que no se produce de manera natural descrito en el presente documento. De manera similar, se entiende que puede incluirse cualquier combinación de tres o más enzimas de una ruta biosintética en un organismo microbiano que no se produce de manera natural descrito en el presente documento, por ejemplo, 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, α -cetoglutarato descarboxilasa y semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA; semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA y succinil-CoA sintetasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y glutamato:semialdehído succínico transaminasa, y así sucesivamente, según se desee, siempre que la combinación de enzimas de la ruta biosintética deseada de cómo resultado la producción del producto deseado correspondiente.

De manera similar, por ejemplo, con respecto a uno cualquiera o más ácidos nucleicos exógenos introducidos para conferir producción de BDO, un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta biosintética de BDO puede comprender al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican para enzimas deseadas, tales como la combinación de 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y α -cetoglutarato descarboxilasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y butirato cinasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y fosfotransbutirilasa; 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa y aldehído deshidrogenasa; 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa y alcohol deshidrogenasa; 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa y una aldehído/alcohol deshidrogenasa, y similares. Por tanto, se entiende que puede incluirse cualquier combinación de dos o más enzimas de una ruta biosintética en un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la invención. De manera similar, se entiende que puede incluirse cualquier combinación de tres o más enzimas de una ruta biosintética en un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la invención, por ejemplo, 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, α -cetoglutarato descarboxilasa y 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, butirato cinasa y fosfotransbutirilasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa y aldehído deshidrogenasa; 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa, aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa; butirato cinasa, fosfotransbutirilasa y una aldehído/alcohol deshidrogenasa, y similares. De manera similar, puede incluirse cualquier combinación de cuatro, cinco o más enzimas de una ruta biosintética tal como se da a conocer en el presente documento en un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la invención, según se desee, siempre que la combinación de enzimas de la ruta biosintética deseada de cómo resultado la producción del producto deseado correspondiente.

Cualquiera de los organismos microbianos que no se producen de manera natural descritos anteriormente puede cultivarse para producir y/o secretar los productos biosintéticos descritos en el presente documento. Los productores de BDO pueden cultivarse para la producción biosintética de BDO. El BDO puede aislarse o someterse a tratamientos adicionales para la síntesis química de compuestos de la familia de BDO tales como los compuestos posteriores mostrados a modo de ejemplo en la figura 1.

El medio de crecimiento puede ser, por ejemplo, cualquier fuente de hidratos de carbono que pueda suministrar una fuente de carbono al microorganismo que no se produce de manera natural. Tales fuentes incluyen, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Otras fuentes de hidratos de carbono incluyen, por ejemplo, materias primas renovables y biomasa. Los tipos a modo de ejemplo 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. Tales materias primas de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de hidratos de carbono útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que también pueden usarse materias primas renovables y biomasa distintas de las mostradas a modo de ejemplo anteriormente para cultivar los organismos microbianos de la invención para la producción de 4-HB y otros compuestos de la invención.

Por consiguiente, dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que puede producirse un organismo microbiano que no se produce de manera natural que secreta los compuestos biosintetizados cuando se hace crecer sobre una fuente de carbono tal como un hidrato de carbono. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, 4-HB, BDO y cualquiera de los metabolitos intermedios en la ruta de 4-HB, la ruta de BDO y/o las rutas combinadas de 4-HB y BDO. Lo único que se requiere es modificar por ingeniería genética una o más de las actividades enzimáticas mostradas en la figura 2 para lograr la biosíntesis del

compuesto o producto intermedio deseado incluyendo, por ejemplo, la inclusión de parte o la totalidad de las rutas biosintéticas de 4-HB y/o BDO. Por consiguiente, la invención proporciona un organismo microbiano que no se produce de manera natural que secreta 4-HB cuando se hace crecer sobre un hidrato de carbono, secreta BDO cuando se hace crecer sobre un hidrato de carbono y/o secreta cualquiera de los metabolitos intermedios mostrados en la figura 2 cuando se hace crecer sobre un hidrato de carbono. Los organismos microbianos productores de BDO de la invención pueden iniciar la síntesis, por ejemplo, a partir de succinato, succinil-CoA, α -cetoglutarato, semialdehído succínico, 4-HB, 4-hidroxibutirilfosfato, 4-hidroxibutiril-CoA (4-HB-CoA) y/o 4-hidroxibutiraldehído.

En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo incluyen condiciones de crecimiento o mantenimiento anaerobias o sustancialmente anaerobias. Anteriormente se han descrito condiciones anaerobias a modo de ejemplo y se conocen bien en la técnica. A continuación en los ejemplos se describen condiciones anaerobias a modo de ejemplo para procedimientos de fermentación. Cualquiera de estas condiciones pueden emplearse con los organismos microbianos que no se producen de manera natural así como otras condiciones anaerobias bien conocidas en la técnica. En tales condiciones anaerobias, los productores de 4-HB y BDO pueden sintetizar 4-HB monomérico y BDO, respectivamente, a concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más así como todas las demás concentraciones mostradas a modo de ejemplo anteriormente.

También pueden generarse varios compuestos posteriores para los organismos microbianos que no se producen de manera natural productores de BDO de la invención.

Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción biosintética de cantidades comerciales de BDO. Generalmente, y como con procedimientos de cultivo no continuos, la producción continua y/o casi continua de BDO incluirá cultivar un organismo productor de BDO que no se produce de manera natural de la invención en medio y nutrientes suficientes para sustentar y/o casi sustentar el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo en tales condiciones puede incluir, por ejemplo, 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días o más. Adicionalmente, el cultivo continuo puede incluir 1 semana, 2, 3, 4 ó 5 o más semanas y hasta varios meses. Alternativamente, pueden cultivarse organismos de la invención durante horas, si es adecuado para una aplicación particular. Debe entenderse que las condiciones de cultivo continuo y/o casi continuo también pueden incluir todos los intervalos de tiempo entre estos periodos a modo de ejemplo.

En la técnica se conocen bien procedimientos de fermentación. En resumen, la fermentación para la producción biosintética de BDO puede usarse, por ejemplo, en la fermentación de alimentación discontinua y separación discontinua; fermentación de alimentación discontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Ejemplos de procedimientos de fermentación discontinuos y continuos bien conocidos en la técnica se muestran a modo de ejemplo a continuación adicionalmente en los ejemplos.

Además de los procedimientos de fermentación anteriores que usan los productores de BDO de la invención para la producción continua de cantidades sustanciales de BDO, respectivamente, de manera similar los productores de BDO pueden, por ejemplo, someterse simultáneamente a procedimientos de síntesis química tal como se describió anteriormente para la conversión química de BDO, por ejemplo, en THF, GBL, pirrolidonas y/u otros compuestos de la familia de BDO. Además, los productos de los productores de BDO pueden separarse del cultivo de fermentación y someterse secuencialmente a conversión química, tal como se da a conocer en el presente documento.

En resumen, la hidrogenación de GBL en el caldo de fermentación puede realizarse tal como se describe por Frost *et al.*, *Biotechnology Progress* 18: 201-211 (2002). Otro procedimiento para la hidrogenación durante la fermentación incluye, por ejemplo, los métodos descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.478.952. Este método se muestra a modo de ejemplo adicionalmente en los siguientes ejemplos.

La descripción proporciona adicionalmente un método de fabricación de γ -butirolactona (GBL), tetrahydrofurano (THF) o 1,4-butanodiol (BDO). El método incluye fermentar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) y/o 1,4-butanodiol (BDO), las rutas comprenden al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxibutirato:CoA transferasa, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, α -cetoglutarato descarboxilasa, glutamato descarboxilasa, 4-hidroxibutanoato cinasa, fosfotransbutirilasa, 1,4-butanodiol semialdehído deshidrogenasa independiente de CoA, 1,4-butanodiol semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA, 1,4-butanodiol alcohol deshidrogenasa independiente de CoA o 1,4-butanodiol alcohol deshidrogenasa dependiente de CoA, en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO), GBL o THF, comprendiendo la fermentación fermentación de alimentación discontinua y separación discontinua; fermentación de alimentación discontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua.

Además de la biosíntesis de BDO y otros productos tal como se describe en el presente documento, los organismos microbianos que no se producen de manera natural y métodos de la invención también pueden usarse en diversas combinaciones entre sí y con otros organismos microbianos y métodos bien conocidos en la técnica para lograr la biosíntesis de producto mediante otras rutas.

Un método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la biosíntesis de un producto es el la infraestructura computacional OptKnock, Burgard *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 84: 647-57 (2003). OptKnock es un programa de modelado y simulación metabólicos que sugiere estrategias de delección génica que dan como resultado microorganismos genéticamente estables que sobreproducen el producto objetivo. Específicamente, la infraestructura examina la red metabólica y/o bioquímica completa de un microorganismo con el fin de sugerir manipulaciones genéticas que fuerzan que el producto bioquímico deseado se convierta en un subproducto obligatorio del crecimiento celular. Acoplando la producción de producto bioquímico con el crecimiento celular a través de delecciones génicas estratégicamente colocadas u otra alteración génica funcional, las presiones de selección de crecimiento impuestas sobre las cepas modificadas por ingeniería genética tras largos periodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción de producto bioquímico obligatoria acoplada con el crecimiento. Por último, cuando se construyen delecciones génicas hay una posibilidad despreciable de que las cepas diseñadas vuelvan a sus estados de tipo natural porque los genes seleccionados por OptKnock se eliminan completamente del genoma. Por tanto, esta metodología computacional puede o bien usarse para identificar rutas alternativas que conducen a la biosíntesis de 4-HB y/o BDO o bien usarse en relación con los organismos microbianos que no se producen de manera natural para la optimización adicional de la biosíntesis de 4-HB y/o BDO.

En resumen, OptKnock es un término usado en el presente documento para hacer referencia a un método y sistema computacional para modelar el metabolismo celular. El programa OptKnock se refiere a una infraestructura de modelos y métodos que incorporan limitaciones particulares a modelos de análisis de equilibrio de flujos (FBA). Estas limitaciones incluyen, por ejemplo, información cinética cualitativa, información reguladora cualitativa y/o datos experimentales de microalineamientos de ADN. OptKnock también calcula soluciones a diversos problemas metabólicos, por ejemplo, estrechando los límites de flujo derivados a través de modelos de equilibrio de flujos y posteriormente investigando los límites de rendimiento de redes metabólicas en presencia de adiciones o delecciones génicas. La infraestructura computacional OptKnock permite la construcción de formulaciones de modelo que permiten una consulta eficaz de los límites de rendimiento de redes metabólicas y proporciona métodos para solucionar los problemas de programación lineal en enteros mixta resultantes. Los métodos de modelado y simulación metabólicos denominados en el presente documento OptKnock se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/043.440, presentada el 10 de enero de 2002, y en la patente internacional n.º PCT/US02/00660, presentada el 10 de enero de 2002.

Otro método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la producción biosintética de un producto es el sistema de modelado y simulación metabólicos denominado SimPheny[®]. Este método y sistema computacional se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/173.547, presentada el 14 de junio de 2002, y en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US03/18838, presentada el 13 de junio de 2003.

SimPheny[®] es un sistema computacional que puede usarse para producir un modelo de red *in silico* y para simular el flujo de masa, energía o carga a través de las reacciones químicas de un sistema biológico para definir un espacio de solución que limita todas y cada una de las posibles funcionalidades de las reacciones químicas en el sistema, determinando de ese modo un intervalo de actividades permitidas para el sistema biológico. Este enfoque se denomina modelado basado en limitaciones porque el espacio de solución se define por limitaciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas así como limitaciones de capacidad y termodinámica de reacción asociadas con flujos máximos a través de las reacciones. Puede consultarse el espacio definido por estas limitaciones para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos. Pueden usarse métodos de análisis tales como análisis convexo, programación lineal y el cálculo de rutas extremas tal como se describe, por ejemplo, en Schilling *et al.*, *J. Theor. Biol.* 203:229-248 (2000); Schilling *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 71:286-306 (2000) y Schilling *et al.*, *Biotech. Prog.* 15:288-295 (1999), para determinar tales capacidades fenotípicas. Tal como se describe en los ejemplos a continuación, esta metodología de computación se usó para identificar y analizar las rutas biosintéticas de 4-HB viables así como las óptimas en organismos microbianos no productores de 4-HB.

Tal como se describió anteriormente, un método basado en limitaciones usado en los programas computacionales aplicables a la invención es el análisis de equilibrio de flujos. El análisis de equilibrio de flujos se basa en equilibrar los flujos en una condición de estado estacionario y puede realizarse tal como se describe, por ejemplo, en Varma y Palsson, *Biotech. Bioeng.* 12:994-998 (1994). Se han aplicado enfoques de equilibrio de flujos a redes de reacción para simular o predecir propiedades sistémicas, por ejemplo, del metabolismo de adipocitos tal como se describe Fell y Small, *J. Biochem.* 138:781-786 (1986), la secreción de acetato a partir de *E. coli* en condiciones de maximización de ATP tal como se describe en Majewski y Domach, *Biotech. Bioeng.* 35:732-738 (1990) o la secreción de etanol por levadura tal como se describe en Vanrolleghem *et al.*, *Biotech. Prog.* 12:434-448 (1996). Adicionalmente, este enfoque puede usarse para predecir o simular el crecimiento de *E. coli* en una variedad de fuentes de carbono individual así como el metabolismo de *H. influenzae* tal como se describe en Edwards y Palsson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:5528-5533 (2000), Edwards y Palsson, *J. Bio. Chem.* 274:17410-17416 (1999) y Edwards *et al.*, *Nature Biotech.* 19:125-130 (2001).

Una vez definido el espacio de solución, puede analizarse para determinar posibles soluciones en diversas condiciones. Este enfoque computacional concuerda con realidades biológicas porque los sistemas biológicos son flexibles y pueden alcanzar el mismo resultado de muchas maneras diferentes. Los sistemas biológicos se diseñan a través de mecanismos evolutivos que se han limitado mediante limitaciones fundamentales a las que deben enfrentarse todos los sistemas vivos. Por tanto, la estrategia de modelado basado en limitaciones acepta estas realidades generales. Además, la capacidad para imponer continuamente restricciones adicionales en un modelo de red a través del estrechamiento de limitaciones da como resultado una reducción del tamaño del espacio de solución, potenciando de ese modo la precisión con la que puede predecirse el rendimiento fisiológico o el fenotipo.

Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica podrán aplicar diversas infraestructuras computacionales para el modelado y la simulación metabólicos para diseñar e implementar la biosíntesis de 4-HB, BDO, GBL, THF y otros compuestos de la familia de BDO en organismos microbianos huésped distintos de *E. coli* y levadura. Tales métodos de modelado y simulación metabólicos incluyen, por ejemplo, los sistemas computacionales mostrados a modo de ejemplo anteriormente como SimPheny® y OptKnock. Para ilustración de la invención, se describen algunos métodos en el presente documento con referencia a la infraestructura computacional OptKnock para el modelado y la simulación. Los expertos en la técnica sabrán cómo aplicar la identificación, el diseño y la implementación de las alteraciones metabólicas usando OptKnock a cualquiera de tales otros métodos e infraestructuras computacionales de modelado y simulación metabólicos bien conocidos en la técnica.

La capacidad de una célula o un organismo para producir de manera biosintética un producto bioquímico puede ilustrarse en el contexto de los límites de producción de producto bioquímico de una red metabólica típica calculada usando un modelo *in silico*. Estos límites se obtienen fijando la(s) tasa(s) de captación del/de los sustrato(s) limitante(s) a su(s) valor(es) medido(s) experimentalmente y calculando las tasas máxima y mínima de producción de producto bioquímico a cada nivel de crecimiento alcanzable.

La producción de un producto bioquímico deseado está generalmente en competición directa con la formación de biomasa para recursos intracelulares. En estas circunstancias, tasas potenciadas de producción de producto bioquímico darán necesariamente como resultado tasas de crecimiento inferiores a la máxima. Las desactivaciones sugeridas por los programas de modelado y simulación metabólicos anteriores tales como OptKnock se diseñan para limitar los límites de solución permisibles forzando un cambio en el comportamiento metabólico a partir de la cepa de tipo natural. Aunque los límites de solución reales para una cepa dada se expandirán o se contraerán a medida que aumente(n) o disminuya(n) la(s) tasa(s) de captación de sustrato, cada punto experimental se encontrará dentro de ese límite de solución calculado. Gráficos como estos permiten predicciones precisas de lo cerca que están las cepas diseñadas de sus límites de rendimiento, lo que también indica cuánto espacio queda disponible para mejoras.

La infraestructura matemática de OptKnock se muestra a modo de ejemplo en el presente documento para precisar delecciones génicas que conducen a la biosíntesis de producto y, particularmente, biosíntesis de producto acoplada con el crecimiento. El procedimiento se desarrolla sobre el modelado metabólico basado en limitaciones que estrecha el intervalo de fenotipos posibles que puede presentar un sistema celular a través de la imposición sucesiva de limitaciones fisicoquímicas gobernantes, Price *et al.*, Nat Rev Microbiol, 2: 886-97 (2004). Tal como se describió anteriormente, los modelos y las simulaciones basados en limitaciones se conocen bien en la técnica y generalmente invocan la optimización de un objetivo celular particular, sujeto a la estequiometría de la red, para sugerir una distribución de flujos probable.

En resumen, la maximización de un objetivo celular cuantificado como un flujo de reacción agregado para una red metabólica en estado estacionario que comprende un conjunto $N = \{1, \dots, N\}$ de metabolitos y un conjunto $M = \{1, \dots, M\}$ de reacciones metabólicas se expresa matemáticamente de la siguiente manera:

maximizar $V_{\text{objetivo celular}}$

someter a
$$\sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0 \quad \forall i \in N$$

$$V_{\text{sustrato}} = V_{\text{captación_sustrato}} \text{ mmol/gDW}\cdot\text{h} \quad \forall i \in \{\text{sustrato(s) limitante(s)}\}$$

$$V_{\text{atp}} \geq V_{\text{mant_atp}} \text{ mmol/gDW}\cdot\text{h}$$

$$v_j \geq 0, \quad \forall j \in \{\text{reacciones irrev.}\}$$

en donde S_{ij} es el coeficiente estequiométrico del metabolito i en la reacción j , v_j es el flujo de la reacción j , $V_{\text{captación_sustrato}}$ representa la(s) tasa(s) de captación supuesta(s) o medida(s) del/de los sustrato(s) limitante(s) y $V_{\text{mant_atp}}$ es el requisito de mantenimiento de ATP no asociado con el crecimiento. El vector v incluye flujos tanto

internos como externos. En este estudio, con frecuencia se supone que el objetivo celular es un consumo de precursores biosintéticos en las razones requeridas para la formación de biomasa, Neidhardt, F.C. *et al.*, *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2ª ed. 1996, Washington, D.C.: ASM Press. 2 v. (xx, 2822, 1xxvi). Los flujos se notifican generalmente por 1 gDW·h (gramo de peso en seco por hora) de tal manera que la formación de biomasa se expresa como g de biomasa producida/gDW·h o l/h.

El modelado de deleciones génicas, y por tanto la eliminación de reacción, emplea en primer lugar la incorporación de variables binarias en la infraestructura de enfoque basado en limitaciones, Burgard *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 74: 364-375 (2001), Burgard *et al.*, *Biotechnol Prog*, 17: 791-797 (2001). Estas variables binarias,

$$y_j = \begin{cases} 1, & \text{si el flujo de reacción } v_j \text{ es activo} \\ 0, & \text{si el flujo de reacción } v_j \text{ no es activo} \end{cases}, \forall j \in M$$

asumen un valor de 1 si la reacción j es activa y un valor de 0 si es inactiva. La siguiente limitación,

$$v_j^{\min} \cdot y_j \leq v_j \leq v_j^{\max} \cdot y_j, \forall j \in M$$

garantiza que el flujo de reacción v_j sólo se fija a cero si la variable y_j es igual a cero. Alternativamente, cuando y_j es igual a uno, v_j es libre de asumir cualquier valor entre un límite inferior v_j^{\min} y uno superior v_j^{\max} . En este caso, v_j^{\min} y v_j^{\max} se identifican minimizando y maximizando, respectivamente, cada flujo de reacción sujeto a las limitaciones de red descritas anteriormente, Mahadevan *et al.*, *Metab Eng*, 5: 264-76 (2003).

Se identifican desactivaciones génicas/de reacción óptimas resolviendo un problema de optimización de dos niveles que elige el conjunto de reacciones activas ($y_j = 1$) de tal manera que una solución de crecimiento óptima para la red resultante sobreproduce el producto químico de interés. Matemáticamente, este problema de optimización de dos niveles se expresa como el siguiente problema de optimización en enteros mixta de dos niveles:

maximizar $V_{\text{producto_químico}}$ (OptKnock)

$$\left(\begin{array}{l} y_j \\ \text{someter a maximizar } v_{\text{biomasa}} \\ v_j \\ \text{someter a } \sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0, \quad \forall i \in N \\ v_{\text{sustrato}} = v_{\text{captación_sustrato}} \quad \forall i \in \{\text{sustrato(s) limitante(s)}\} \\ v_{\text{atp}} \geq v_{\text{mant_atp}} \end{array} \right)$$

$$v_{\text{biomasa}} \geq v_{\text{biomasa}}^{\text{objetivo}}$$

$$v_j^{\min} \cdot y_j \leq v_j \leq v_j^{\max} \cdot y_j, \quad \forall j \in M$$

$$\sum_{j \in M^{\text{directa}}} (1 - y_j) = K$$

$$y_j \in \{0,1\}, \quad \forall j \in M$$

en donde $V_{\text{producto_químico}}$ es la producción del producto objetivo deseado, por ejemplo succinato u otro producto bioquímico, y K es el número de desactivaciones permisibles. Obsérvese que fijar K igual a cero devuelve la solución de biomasa máxima de la red completa, mientras que fijar K igual a uno identifica la desactivación génica/de reacción individual ($y_j = 0$) de tal manera que la red resultante implica la sobreproducción máxima dado su rendimiento de biomasa máximo. La limitación final garantiza que la red resultante cumple con un rendimiento de

biomasa mínimo. Burgard *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 84: 647-57 (2003), proporcionan una descripción más detallada del procedimiento de formulación y solución de modelos. Pueden solucionarse problemas que contienen cientos de variables binarias en cuestión de minutos a horas usando CPLEX 8,0, *GAMS: The Solver Manuals*. 2003: GAMS Development Corporation, al que se accede a través de GAMS, Brooke *et al.*, *GAMS Development Corporation* (1998), entorno de modelado en una estación de trabajo IBM RS6000-270. La infraestructura OptKnock ya ha podido identificar estrategias de delección génica prometedoras para la sobreproducción de producto bioquímico, Burgard *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 84: 647-57 (2003), Pharkya *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 84: 887-899 (2003), y establece una infraestructura sistemática que abarcará naturalmente futuras mejoras de infraestructuras de modelado metabólico y regulador.

Cualquier solución del problema de OptKnock de dos niveles descrito anteriormente proporcionará un conjunto de reacciones metabólicas para alterar. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto o la modificación metabólica puede dar como resultado 4-HB o BDO como producto obligatorio durante la fase de crecimiento del organismo. Dado que se conocen las reacciones, una solución del problema de OptKnock de dos niveles también proporcionará el gen o los genes asociados que codifican para una o más enzimas que catalizan cada reacción dentro del conjunto de reacciones. La identificación de un conjunto de reacciones y sus correspondientes genes que codifican para las enzimas que participan en cada reacción es generalmente un procedimiento automatizado, logrado a través de correlación de las reacciones con una base de datos de reacciones que tiene una relación entre enzimas y genes codificantes.

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que deben alterarse con el fin de lograr la producción de 4-HB o BDO se implementa en la célula o el organismo diana mediante alteración funcional de al menos un gen que codifica para cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio particularmente útil para lograr la alteración funcional del conjunto de reacciones es mediante delección de cada gen codificante. Sin embargo, en algunos casos, puede ser beneficioso alterar la reacción mediante otras aberraciones genéticas incluyendo, por ejemplo, mutación, delección de regiones reguladoras tales como promotores o sitios de unión en cis para factores reguladores, o mediante truncamiento de la secuencia codificante en cualquiera de varias ubicaciones. Estas últimas aberraciones, que dan como resultado menos que la delección total del conjunto de genes pueden ser útiles, por ejemplo, cuando se desean evaluaciones rápidas del acoplamiento de succinato o cuando es menos probable que se produzca reversión genética.

Para identificar soluciones productivas adicionales al problema de OptKnock de dos niveles descrito anteriormente que conducen a conjuntos adicionales de reacciones para alterar o modificaciones metabólicas que pueden dar como resultado la biosíntesis, incluyendo la biosíntesis acoplada con el crecimiento de 4-HB u otro producto bioquímico, puede implementarse un método de optimización, denominado corte en enteros. Este método avanza resolviendo de manera iterativa el problema de OptKnock mostrado a modo de ejemplo anteriormente con la incorporación de una limitación adicional denominada corte en enteros en cada iteración. Las limitaciones de corte en enteros impiden eficazmente que el procedimiento de solución escoja exactamente el mismo conjunto de reacciones identificado en una iteración anterior que obligatoriamente acopla la biosíntesis de producto con el crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica acoplada con el crecimiento anteriormente identificada especifica las reacciones 1, 2 y 3 para su alteración, entonces la siguiente limitación impide que se consideren simultáneamente las mismas reacciones en soluciones posteriores: $y_1 + y_2 + y_3 \geq 1$. El método de corte en enteros se conoce bien en la técnica en la técnica y puede encontrarse descrito, por ejemplo, en la referencia Burgard *et al.*, *Biotechnol Prog*, 17: 791-797 (2001). Como con todos los métodos descritos en el presente documento con referencia a su uso en combinación con la infraestructura computacional OptKnock para el modelado y la simulación metabólicos, el método de corte en enteros de reducción de la redundancia en análisis computacional iterativo también puede aplicarse con otras infraestructuras computacionales bien conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, SimPheny®.

Las limitaciones de la forma anterior excluyen la identificación de conjuntos de reacciones mayores que incluyen conjuntos anteriormente identificados. Por ejemplo, el empleo del método de optimización de corte en enteros anterior en una iteración adicional excluirá la identificación de un conjunto de reacciones cuádruple que especifique las reacciones 1, 2 y 3 para su alteración ya que estas reacciones se identificaron anteriormente. Para garantizar la identificación de todos los posibles conjuntos de reacciones que conducen a la producción biosintética de un producto, puede emplearse una modificación del método de corte en enteros.

En resumen, el procedimiento de corte en enteros modificado comienza con la iteración "cero" que calcula la producción máxima del producto bioquímico deseado a un crecimiento óptimo para una red de tipo natural. Este cálculo corresponde a una solución de OptKnock con K igual a 0. A continuación, se consideran desactivaciones individuales y se introducen los dos conjuntos de parámetros, $objalmacena_{iter}$ y $yalmacena_{iter,j}$, para almacenar la función objetivo ($v_{producto_químico}$) y la información de activación-desactivación de reacción (y_j), respectivamente, en cada iteración, *iter*. Entonces se añaden sucesivamente las siguientes limitaciones a la formulación de OptKnock en cada iteración.

$$v_{producto_químico} \geq objalmacena_{iter} + \varepsilon - M \cdot \sum_{j \in yalmacena_{iter,j}=0} y_j$$

En la ecuación anterior, ε y M son un número pequeño y uno grande, respectivamente. En general, ε puede fijarse a aproximadamente 0,01 y M puede fijarse a aproximadamente 1000. Sin embargo, también pueden usarse números más pequeños y/o más grandes que estos números. M garantiza que la limitación sólo puede ser vinculante para estrategias de desactivación anteriormente identificadas, mientras que ε garantiza que la adición de desactivaciones a una estrategia anteriormente identificada debe conducir a un aumento de al menos ε en la producción de producto bioquímico a crecimiento óptimo. El enfoque pasa a delecciones dobles siempre que una estrategia de delección individual no logre mejorar la cepa de tipo natural. Entonces se consideran delecciones triples cuando ninguna estrategia de delección doble mejora la cepa de tipo natural, y así sucesivamente. El resultado final es una lista clasificada, representada como la producción de producto bioquímico deseado a crecimiento óptimo, de distintas estrategias de delección que se diferencian unas de otras en al menos una desactivación. Este procedimiento de optimización así como la identificación de una amplia variedad de conjuntos de reacciones que, cuando se alteran, conducen a la biosíntesis, incluyendo la producción acoplada con el crecimiento, de un producto bioquímico. Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que los métodos y diseños de modificación por ingeniería genética metabólica mostrados a modo de ejemplo en el presente documento son igualmente aplicables para identificar nuevas rutas biosintéticas y/o para el acoplamiento obligatorio del crecimiento de células o microorganismos con cualquier producto bioquímico.

Los métodos mostrados a modo de ejemplo anteriormente e ilustrados adicionalmente en los ejemplos a continuación permiten la construcción de células y organismos que producen de manera biosintética, incluyendo la producción de un producto bioquímico objetivo acoplada obligatoriamente con el crecimiento de la célula u organismo modificado por ingeniería genética para albergar las alteraciones genéticas identificadas. Con respecto a esto, se han identificado alteraciones metabólicas que dan como resultado la biosíntesis de 4-HB y 1,4-butanodiol. Las cepas de microorganismos construidas con las alteraciones metabólicas identificadas producen niveles elevados de 4-HB o BDO en comparación con organismos microbianos sin modificar. Estas cepas pueden usarse de manera beneficiosa para la producción comercial de 4-HB, BDO, THF y GBL, por ejemplo, en procedimientos de fermentación continua sin someterse a las presiones de selección negativas.

Por tanto, los métodos computacionales descritos en el presente documento permiten la identificación e implementación de modificaciones metabólicas que se identifican mediante un método *in silico* seleccionado de OptKnock o SimPheny. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir, por ejemplo, la adición de una o más enzimas de ruta biosintética y/o la alteración funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, alteración mediante delección génica.

Se entiende que las modificaciones que no afectan sustancialmente a la actividad de las diversas realizaciones de esta invención también se incluyen dentro de la definición de la invención proporcionada en el presente documento. Por consiguiente, se pretende que los siguientes ejemplos ilustren pero no limiten la presente invención.

EJEMPLO I

Biosíntesis de ácido 4-hidroxi-butanoico

Este ejemplo describe las rutas bioquímicas para la producción de 4-HB.

Informes previos de la síntesis de 4-HB en microbios se han centrado en este compuesto como producto intermedio en la producción del plástico biodegradable poli-hidroxi-alcanoato (PHA) (patente estadounidense n.º 6.117.658). El uso de copolímeros de 4-HB/3-HB con respecto a polímero de poli-3-hidroxi-butirato (PHB) puede dar como resultado plástico que es menos frágil (Saito y Doi, Intl. J. Biol. Macromol. 16:99-104 (1994)). La producción de 4-HB monomérico descrita en el presente documento es un procedimiento fundamentalmente distinto por varios motivos: (1) el producto se secreta, en contraposición a PHA que se produce de manera intracelular y permanece en la célula; (2) para organismos que producen polímeros de hidroxibutanoato, no se produce 4-HB libre, sino que más bien la polihidroxi-alcanoato sintasa usa el derivado de coenzima A; (3) en el caso del polímero, la formación del producto granular cambia la termodinámica; y (4) el pH extracelular no es un problema para la producción del polímero, mientras que afectará si está presente 4-HB en el estado de ácido libre o base conjugada, y también al equilibrio entre 4-HB y GBL.

Puede producirse 4-HB en dos etapas de reducción enzimática a partir de succinato, un metabolito central del ciclo de TCA, con semialdehído succínico como producto intermedio (figura 2). La primera de estas enzimas, semialdehído succínico deshidrogenasa, es nativa para muchos organismos incluyendo *E. coli*, en el que se han encontrado enzimas dependientes tanto de NADH como de NADPH (Donnelly y Cooper, Eur. J. Biochem. 113:555-561 (1981); Donnelly y Cooper, J. Bacteriol. 145:1425-1427 (1981); Marek y Henson, J. Bacteriol. 170:991-994 (1988)). También hay pruebas que apoyan la actividad semialdehído succínico deshidrogenasa en *S. cerevisiae* (Ramos *et al.*, Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985)), y se ha identificado un gen supuesto mediante homología de secuencia. Sin embargo, la mayoría de los informes indican que esta enzima avanza en el sentido de síntesis de succinato, tal como se muestra en la figura 2 (Donnelly y Cooper, citado anteriormente; Lutke-Eversloh y Steinbuechel, FEMS Microbiol. Lett. 181:63-71 (1999)), participando en la ruta de degradación de 4-HB y gamma-

aminobutirato. El semialdehído succínico también se produce de manera nativa por determinados organismos microbianos tales como *E. coli* a través del producto intermedio del ciclo de TCA α -cetoglutarato por medio de la acción de dos enzimas: glutamato:semialdehído succínico transaminasa y glutamato descarboxilasa. Una ruta alternativa, usada por el anaerobio obligado *Clostridium kluyveri* para degradar succinato, activa succinato para dar succinil-CoA, convirtiendo luego succinil-CoA en semialdehído succínico usando una semialdehído succínico deshidrogenasa alternativa que se sabe que funciona en este sentido (Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993)). Sin embargo, esta ruta tiene el coste energético de que se requiere ATP para convertir succinato en succinil-CoA.

La segunda enzima de la ruta, 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, no es nativa para *E. coli* o levadura pero se encuentra en diversas bacterias tales como *C. kluyveri* y *Ralstonia eutropha* (Lutke-Eversloh y Steinbuchel, citado anteriormente; Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996); Valentin *et al.*, Eur. J. Biochem. 227:43-60 (1995); Wolff y Kenealy, Protein Expr. Purif. 6:206-212 (1995)). Se sabe que estas enzimas son dependientes de NADH, aunque también existen formas dependientes de NADPH. Una ruta adicional para dar 4-HB a partir de alfa-cetoglutarato se demostró en *E. coli* dando como resultado la acumulación de poli(ácido 4-hidroxi-butírico) (Song *et al.*, Wei Sheng Wu Xue. Bao. 45:382-386 (2005)). La cepa recombinante requería la sobreexpresión de tres genes heterólogos, PHA sintasa (*R. eutropha*), 4-hidroxi-butirato deshidrogenasa (*R. eutropha*) y 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa (*C. kluyveri*), junto con dos genes de *E. coli* nativos: glutamato:semialdehído succínico transaminasa y glutamato descarboxilasa. Las etapas 4 y 5 en la figura 2 pueden llevarse a cabo alternativamente mediante una alfa-cetoglutarato descarboxilasa tal como la identificada en *Euglena gracilis* (Shigeoka *et al.*, Biochem. J. 282(Pt2):319-323 (1992); Shigeoka y Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991); Shigeoka y Nakano, Biochem J. 292(Pt 2):463-467 (1993)). Sin embargo, esta enzima no se ha aplicado previamente para tener un impacto en la producción de 4-HB o polímeros relacionados en ningún organismo.

La direccionalidad notificada de semialdehído succínico deshidrogenasa condujo a la investigación de la termodinámica del metabolismo de 4-HB. Específicamente, este estudio investigó si las reacciones implicadas en la conversión de succinato o succinil-CoA en 4-HB son favorables termodinámicamente o no (es decir, $\Delta G_r < 0$) en las condiciones fisiológicas típicas presentes en *E. coli* y *S. cerevisiae*. Se supuso que todas las reacciones de oxidación/reducción usaban NADH, aunque los resultados de la suposición del uso de NADPH serían similares. Se calcularon las energías libres de Gibbs convencionales de formación (ΔG_f°) para cada compuesto en las rutas de succinato y succinil-CoA mostradas en la figura 2 basándose en el método de contribución de grupos (Mavrouniotis, M.L., J. Biol. Chem. 266:14440-14445 (1991)). Entonces se transformó cada energía de Gibbs convencional de formación con el fin de obtener un criterio de cambio espontáneo a presión, temperatura, pH y fuerza iónica especificados (Alberty, R.A., Biochem. Biophys. Acta 1207:1-11 (1994)) (ecuación 1).

$$\Delta G_f'(I, pH) = \Delta G_f^\circ(I = 0) + N_H RT \ln(10^{pH}) - 2,915\sqrt{I} \frac{z^2 - N_H}{1 + B\sqrt{I}} \quad (1)$$

En donde ΔG_f° es la energía de Gibbs convencional de formación, N_H es el número de átomos de hidrógeno en el compuesto, R es la constante de gases universal, T es constante a 298 K, z es la carga de la molécula al pH de interés, I es la fuerza iónica en M y B es una constante igual a $1,6 \text{ L}^{0,5}/\text{mol}^{0,5}$.

La ecuación 1 revela que tanto el pH intracelular como la fuerza iónica desempeñan un papel en la determinación de la viabilidad termodinámica. Normalmente, el pH intracelular de las células está muy bien regulado, incluso cuando hay grandes variaciones en el pH del cultivo. En la bibliografía se ha notificado el pH intracelular tanto de *E. coli* como de *S. cerevisiae*. *E. coli* mantiene un pH intracelular de 7,4-7,7 durante condiciones de crecimiento típicas en tampones neutros, pero puede descender hasta 7,2 en medio a pH 6, e incluso llegar hasta tan sólo 6,9 para un pH externo de 5 (Riondet *et al.*, Biotechnology Tech. 11:735-738 (1997)). Sin embargo, el crecimiento de *E. coli* se ve gravemente inhibido a un pH externo por debajo de 6. El pH de las levaduras presenta más variación. Durante la fase de crecimiento exponencial, se ha medido que el pH interno de *S. cerevisiae* está en el intervalo de 6,7-7,0 con un pH externo controlado a 5,0 (Dombek e Ingram, Appl. Environ. Microbiol. 53:1286-1291 (1987)). Por otro lado, en células en reposo el pH interno desciende hasta por debajo de 6 cuando el pH externo es de 6 o menos (Imai y Ohno, J. Biotechnol. 38:165-172 (1995)). Este análisis supone un pH intracelular de 7,4 para *E. coli* y 6,8 para *S. cerevisiae*. También se supuso una fuerza iónica de 0,15 (Valenti *et al.*, citado anteriormente).

Se calcularon las energías de Gibbs transformadas de formación en el estado convencional (pH = 7,0, I = 0) y en los estados fisiológicos de *E. coli* (pH = 7,4, I = 0,15) y *S. cerevisiae* (pH = 6,8, I = 0,15). Entonces se calcularon las energías de Gibbs transformadas de reacción ($\Delta G_r'$) tomando la diferencia en $\Delta G_f'$ entre los productos y los reactivos. Las energías de Gibbs transformadas de las reacciones necesarias para convertir succinato o succinil-CoA en 4-HB se proporcionan en la tabla 2. Aunque algunas de las etapas tienen valores de delta G positivos calculados, los errores estándar de estos cálculos y gradientes de concentración indican que cualquiera de las etapas es viable. Obsérvese que el error estándar, $U_{f,est}$, en ΔG_r calculado mediante la teoría de contribución de grupos es de 4 kcal/mol. La incertidumbre en ΔG_r , $U_{r,est}$, puede calcularse como la norma euclidiana de la

incertidumbre para ΔG_r de cada compuesto (ecuación).

$$U_{r,est} = \sqrt{\sum_{i=1}^m n_i^2 * U_{f,est}^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^m 16n_i^2} \quad (2)$$

- 5 En donde n es el coeficiente estequiométrico e i es el compuesto. Para las reacciones examinadas, esta incertidumbre es del orden de 8 kcal/mol.

10 Tabla 2. Energía libre de Gibbs de reacción (kcal/mol) a valores de pH y fuerza iónica diferentes. La primera columna es en condiciones convencionales, mientras que las otras se ajustan según la ecuación 1. La temperatura es constante a 298 K. Las barras de error para estos valores son del orden de 8 kcal/mol, tal como se calcula mediante la ecuación 2. Abreviaturas: succ, succinato, sucса, semialdehído succínico; succoa, succinil-CoA; Pi, fosfato inorgánico.

Reacción	ΔG_r° pH = 7,0 IS = 0	ΔG_r pH=7,4 IS = 0,15 M	ΔG_r pH = 6,8 IS = 0,15 M
succ + NADH + 2 H+ \rightarrow sucса + NAD + h2o	12,0	14,4	12,8
succ + coa + ATP \rightarrow succoa + ADP + Pi	0,30	-0,03	-0,03
succoa + NADH + H+ \rightarrow sucса + NAD + coa	4,4	7,0	6,2
sucса + NADH + H+ \rightarrow 4-HB + NAD	-5,0	-3,8	-4,6

- 15 La tabla 2 revela que la reacción que es más probable que encuentre una barrera termodinámica tras considerar la posible incertidumbre en los cálculos es la semialdehído succínico deshidrogenasa (etapa 1 en la figura 2). También se estudió si esta reacción puede impulsarse más cerca de la viabilidad termodinámica variando las concentraciones supuestas de los metabolitos participantes. Por ejemplo, las energías de Gibbs convencionales suponen concentraciones de 1 M para todos los compuestos participantes (excepto agua). En un entorno anaerobio, NADH estará presente a una concentración varias veces superior a la de NAD. Suponiendo $[NADH] = 5 \times [NAD]$, se calculó el efecto sobre ΔG_r usando la ecuación
- 20

$$\Delta G'_f = \Delta G_f^{\circ} + RT \ln \frac{\prod [prod]}{\prod [react]} \quad (3)$$

- 25 Este cambio da como resultado una diferencia de aproximadamente 1 kcal/mol en los valores de delta G para semialdehído succínico deshidrogenasa. También se usó la ecuación 3 para calcular otros efectos sobre ΔG_r , tales como la alta concentración de succinato para impulsar las reacciones. Una diferencia de 1000 veces en las concentraciones de succinato y semialdehído succínico aportará aproximadamente 5 kcal/mol a delta G. Tomado junto con una incertidumbre supuesta de 8 kcal/mol, no puede eliminarse la posibilidad de que la semialdehído succínico deshidrogenasa funcione en el sentido hacia semialdehído succínico en algún conjunto de condiciones fisiológicas. Por tanto, la ruta directa desde succinato hasta 4-HB sigue en consideración en el análisis posterior.
- 30

35 Se exploraron las capacidades de producción microbiana de 4-hidroxitirato en dos microbios, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, usando modelos metabólicos *in silico* de cada organismo. Las posibles rutas para dar 4-HB avanzan a través de productos intermedios de succinato, succinil-CoA o alfa-cetoglutarato tal como se muestra en la figura 2.

40 Una primera etapa en la producción de 4-HB a partir de succinato implica la conversión de succinato en semialdehído succínico por medio de una semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de NADH o NADPH. En *E. coli*, *gabD* es una semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de NADP y es parte de una agrupación génica implicada en la captación y degradación de 4-aminobutirato (Niegemann *et al.*, Arch. Microbiol. 160:454-460 (1993); Schneider *et al.*, J. Bacteriol. 184:6976-6986 (2002)). Se cree que *sad* codifica para la enzima para la actividad semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de NAD (Marek y Henson, citado anteriormente). *S. cerevisiae* sólo contiene la semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de NADPH, asignada supuestamente a UGA2, que se localiza en el citosol (Huh *et al.*, Nature 425:686-691 (2003)). Los cálculos de rendimiento máximo suponiendo la ruta de succinato para dar 4-HB tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* sólo requieren la suposición de que se ha añadido una 4-HB deshidrogenasa no nativa a sus redes metabólicas.

45

La ruta desde succinil-CoA hasta 4-hidroxitirato se describió en la patente estadounidense n.º 6.117.658 como

parte de un procedimiento para preparar polihidroxicanoatos que comprenden unidades monoméricas de 4-hidroxi-*butirato*. *Clostridium kluyveri* es un organismo de ejemplo que se sabe que presenta actividad semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA (Sohling y Gottschalk, citado anteriormente; Sohling y Gottschalk, citado anteriormente). En este estudio, se supone que esta enzima, de *C. kluyveri* u otro organismo, se expresa en *E. coli* o *S. cerevisiae* junto con una 4-HB deshidrogenasa no nativa o heteróloga para completar la ruta desde succinil-CoA hasta 4-HB. Se demostró la ruta desde alfa-cetoglutarato hasta 4-HB en *E. coli* dando como resultado la acumulación de poli(ácido 4-hidroxi-*butírico*) hasta el 30% del peso celular seco (Song *et al.*, citado anteriormente). Como *E. coli* y *S. cerevisiae* presentan de manera nativa o endógena tanto glutamato:semialdehído succínico transaminasa como glutamato descarboxilasa (Coleman *et al.*, J. Biol. Chem. 276:244-250 (2001)), la ruta desde AKG hasta 4-HB puede completarse en ambos organismos suponiendo sólo que está presente una 4-HB deshidrogenasa no nativa.

EJEMPLO II

15 Producción de ácido 4-hidroxi-*butanoico* en *E. coli*

Este ejemplo describe los rendimientos biosintéticos para ácido 4-hidroxi-*butanoico* que resultan de cada ruta bioquímica.

20 En esta sección, los rendimientos teóricos máximos de 4-HB a partir de glucosa se calculan suponiendo que cada una de las tres rutas metabólicas representadas en la figura 2 son funcionales en *E. coli*. Se usó un modelo metabólico a escala de genoma de *E. coli*, similar al descrito en Reed *et al.*, Genome Biol. 4:R54 (2003), como base para el análisis. La ganancia energética, en cuanto a moléculas de ATP producidas, de cada ruta de rendimiento máximo se calcula suponiendo condiciones anaerobias, a menos que se mencione lo contrario. Se supone que 4-hidroxi-*butirato* sale de *E. coli* por medio de simporte de protones, como es el caso con la mayoría de los ácidos orgánicos. También es posible que GBL se secrete mediante difusión simple, y en este caso el perfil energético será más favorable que en el caso considerado en el presente documento. También se investigó el impacto de la especificidad de cofactor (es decir, dependencia de NADH o NADPH) de las enzimas participantes sobre el rendimiento máximo y el perfil energético de cada ruta.

30 En las tablas 3 A-C se muestran los resultados del análisis. Desde un punto de vista energético y de rendimiento, la ruta de succinato a 4-HB es la más prometedora. Específicamente, los cálculos revelan que el rendimiento teórico máximo de 4-HB a partir de glucosa es de 1,33 mol/mol (0,77 g/g; 0,89 Cmol/Cmol) suponiendo que la ruta de succinato a 4-HB es funcional. Además, la producción anaerobia de 4-HB por medio de succinato dará como resultado la producción neta de o bien 1,8, 1,5 o bien 1,1 mol de ATP por glucosa dependiendo de la especificidad de cofactor supuesta de las enzimas participantes. Estos rendimientos energéticos son comparables a los 2,0 ATP por glucosa que pueden obtenerse por medio de la fosforilación a nivel de sustrato mediante la producción de etanol o lactato, lo que sugiere la posibilidad de producción de homo-4-HB anaerobia en *E. coli*.

40 La ruta de succinil-CoA para dar 4-HB es otra ruta prometedora cuando se consideran el rendimiento máximo y el perfil energético. Puede lograrse un rendimiento de 1,33 mol/mol de 4-HB en *E. coli* si se supone que al menos una de las etapas de la ruta es dependiente de NADH. Sin embargo, debido a que esta ruta requiere la formación de succinil-CoA, su rendimiento energético es inferior al de la ruta de succinato. Se anticipa un requisito de oxígeno a altos rendimientos de 4-HB si se supone que las etapas tanto de semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA como de 4-HB deshidrogenasa son dependientes de NADPH. En este caso, la producción de 4-HB en el rendimiento máximo no dará como resultado una ganancia de ATP neta y posiblemente no soportará las demandas de mantenimiento energético necesarias para la supervivencia de *E. coli*. Por tanto, tendrá que originarse algo de energía a partir de fosforilación oxidativa para permitir la producción de 4-HB homo-fermentativa. La ruta de alfa-cetoglutarato que usa glutamato:succinato semialdehído transaminasa y glutamato descarboxilasa para dar 4-HB es la menos favorable de las tres rutas posibles con un rendimiento máximo que puede lograrse de 1,0 mol de 4-HB por mol de glucosa. Además del rendimiento máximo inferior, esta ruta requiere el uso de 1,5 moles de oxígeno por mol de glucosa convertida en 4-HB. El perfil energético de esta ruta no se ve afectado por la especificidad de cofactor supuesta de 4-HB deshidrogenasa.

55 Tabla 3. La estequiometría de conversión de sustrato global para dar 4-HB suponiendo que las rutas de producción de A) succinato, B) succinil-CoA o C) alfa-cetoglutarato son funcionales en *E. coli*. Se captan glucosa y oxígeno mientras que se producen todas las demás moléculas.

60 A) Ruta de succinato

Especificidad de cofactor	2 etapas de NADH	1 etapa de NADH 1 etapa de NADPH	2 etapas de NADPH
Glucosa	-1,000	-1,000	-1,000
Oxígeno	0,000	0,000	0,000
Protones	1,333	1,333	1,333

4HB	1,333	1,333	1,333
CO2	0,667	0,667	0,667
H2O	0,667	0,667	0,667
ATP	1,800	1,510	1,097

B) Ruta de succinil-CoA

Especificidad de cofactor	2 etapas de NADH	1 etapa de NADH 1 etapa de NADPH	2 etapas de NADPH	2 etapas de NADPH
Glucosa	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000
Oxígeno	0,000	0,000	-0,036	0,000
Protones	1,333	1,333	1,325	1,294
4HB	1,333	1,333	1,325	1,294
CO2	0,667	0,667	0,698	0,082
H2O	0,667	0,667	0,698	0,470
ATP	0,467	0,177	0,000	0,000

5 C) Ruta de alfa-cetoglutarato

Especificidad de cofactor	1 etapa de NADH	1 etapa de NADPH
Glucosa	-1,000	-1,000
Oxígeno	-1,500	-1,500
Protones	1,000	1,000
4HB	1,000	1,000
CO2	2,000	2,000
H2O	2,000	2,000
ATP	5,500	5,500

Con el fin de corroborar las predicciones computacionales propuestas en este informe, pueden construirse y someterse a prueba las cepas que expresan una ruta completa para dar 4-HB. Se realiza la corroboración tanto con *E. coli* (ejemplos II y IV) como con *S. cerevisiae* (ejemplo III). En *E. coli*, se expresan los genes relevantes en un operón sintético detrás de un promotor inducible en un plásmido de número de copias medio o alto; por ejemplo el promotor P_{BAD} que se induce por arabinosa, en un plásmido de la serie pBAD (Guzman *et al.*, J. Bacteriol. 177:4121-4130 (1995)). En *S. cerevisiae*, se integran los genes en el cromosoma detrás del promotor PDC1, reemplazando el gen de piruvato carboxilasa nativo. Se ha notificado que esto da como resultado una expresión de genes foráneos mayor que a partir de un plásmido (Ishida *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 71:1964-1970 (2005)), y también garantizará la expresión durante condiciones anaerobias.

Se hacen crecer células que contienen los constructos relevantes en medios mínimos que contienen glucosa, con adición de arabinosa en el caso de *E. coli* que contiene genes expresados bajo el promotor P_{BAD}. Se toman muestras periódicas para análisis tanto de la expresión génica como de la actividad enzimática. Se realizan ensayos de actividad enzimática en extractos celulares en bruto usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, pueden usarse ensayos basados en la oxidación de NAD(P)H, que se produce en todas las etapas de reacción de deshidrogenasa y puede detectarse mediante espectrofotometría. Además, pueden usarse anticuerpos para detectar el nivel de enzimas particulares. En lugar, o además, de las mediciones de la actividad enzimática, puede aislarse ARN a partir de muestras paralelas y medirse el transcrito del gen de interés mediante PCR con transcriptasa inversa. Se vuelve a analizar cualquier constructo que carezca de expresión de transcrito detectable para garantizar que los ácidos nucleicos codificantes se albergan en una forma expresable. Cuando se detectan transcritos, este resultado indica o bien una falta de traducción o bien producción de enzima inactiva. Pueden emplearse adicionalmente una variedad de métodos bien conocidos en la técnica, tales como optimización de codones, modificación por ingeniería genética de un sitio de unión a ribosoma fuerte, uso de un gen de una especie diferente y prevención de la N-glicosilación (para la expresión de enzimas bacterianas en levadura) mediante la conversión de residuos de Asn en Asp. Una vez detectadas todas las actividades enzimáticas requeridas, la siguiente etapa es medir la producción de 4-HP *in vivo*. Se hacen crecer cultivos en matraz de agitación por triplicado de manera o bien anaerobia o bien microaerobia, dependiendo de las condiciones requeridas (véase anteriormente), y se toman muestras periódicas. Se analizan los ácidos orgánicos presentes en los sobrenadantes de cultivo mediante HPLC usando la columna Aminex AH-87X. El tiempo de elución de 4-HB se determinará usando un patrón adquirido de un proveedor químico.

La ruta independiente de CoA puede implementarse y someterse a prueba para su corroboración. En este caso, los genes sobreexpresados son la semialdehído succínico deshidrogenasa nativa de cada organismo y la 4-hidroxiacetato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha*. Una vez detectadas ambas actividades enzimáticas tal como se comentó anteriormente, se someten a prueba las cepas para determinar la producción de 4-HB. La corroboración también puede obtenerse a partir de la implementación de la ruta dependiente de CoA. La

semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y la 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa de *Clostridium kluyveri* se expresan tal como se describió anteriormente. Además, también puede realizarse la sobreexpresión de la succinil-CoA sintetasa nativa, para canalizar más succinato a la ruta heteróloga. Finalmente, si la producción de 4-HB es desfavorable, pueden someterse a prueba diferentes condiciones de cultivo, tales como un cambio en el estado de oxigenación que puede manipular la razón NAD(P)H/NAD(P).

EJEMPLO III

Producción de ácido 4-hidroxibutanoico en levadura

Este ejemplo describe los rendimientos biosintéticos para ácido 4-hidroxibutanoico que resultan de cada ruta bioquímica en *S. cerevisiae*.

En esta sección, se calculan los rendimientos teóricos máximos de 4-HB a partir de glucosa suponiendo que cada una de las tres rutas metabólicas representadas en la figura 2 es funcional en *S. cerevisiae*. Se usó un modelo metabólico a escala del genoma de *S. cerevisiae*, similar al descrito en Forster *et al.* Genome Res. 13:244-253 (2003) como base para el análisis. Se calcula la ganancia energética de cada ruta de rendimiento máximo suponiendo condiciones anaerobias a menos que se mencione lo contrario. Se supone que 4-hidroxibutirato sale de *S. cerevisiae* por medio de simporte de protones, como es el caso con la mayoría de los ácidos orgánicos. También se investigó el impacto de la especificidad de cofactor (es decir, dependencia de NADH o NADPH) de las enzimas participantes en el rendimiento máximo y el perfil energético de cada ruta.

Los resultados del análisis se muestran en las tablas 4 A-C. Como con *E. coli*, la ruta de succinato a 4-HB es la más prometedora siempre que puedan superarse los problemas termodinámicos planteados en el ejemplo I. Los cálculos revelan que el rendimiento teórico máximo de 4-HB a partir de glucosa es de 1,33 mol/mol (0,77 g/g; 0,89 Cmol/Cmol) en *S. cerevisiae*. Además, la producción anaerobia de 4-HB por medio de succinato dará como resultado la producción neta de o bien 1,4, 1,1 o bien 0,5 mol de ATP por glucosa dependiendo de la especificidad de cofactor supuesta de las enzimas participantes.

La ruta de succinil-CoA para dar 4-HB es la segunda ruta más favorable. Puede lograrse un rendimiento máximo de 1,33 mol de 4-HB/mol de glucosa en *S. cerevisiae* independientemente de la especificidad de cofactor. Sin embargo, la generación de energía neta al rendimiento teórico máximo sólo es posible si se supone que las etapas tanto de semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA como de 4-HB deshidrogenasa son dependientes de NADH. Si cualquier etapa es dependiente de NADPH, no se obtendrá ATP neto a partir de la producción de 4-HB anaerobia y se requerirá una fuente de energía alternativa (por ejemplo, fosforilación oxidativa) para soportar el crecimiento y mantenimiento celular. La ruta de alfa-cetoglutarato para dar 4-HB es la menos favorable de las tres rutas posibles en *S. cerevisiae* aunque el rendimiento máximo de 1,1-1,2 mol de 4-HB por mol de glucosa es ligeramente superior al encontrado en *E. coli*. No obstante, esta ruta requiere una captación de oxígeno de 0,8-0,9 mol de oxígeno por mol de glucosa para llegar a ser energéticamente neutra.

Tabla 4. La estequiometría de conversión de sustrato global para dar 4-HB en *S. cerevisiae*, suponiendo que las rutas de producción de A) succinato, B) succinil-CoA o C) alfa-cetoglutarato son funcionales en *S. cerevisiae*. Se captan glucosa y oxígeno mientras que se producen todas las demás moléculas.

A) Ruta de succinato

Especificidad de cofactor	2 etapas de NADH	1 etapa de NADH 1 etapa de NADPH	2 etapas de NADPH
Glucosa	-1,000	-1,000	-1,000
Oxígeno	0,000	0,000	0,000
Protones	1,333	1,333	1,333
4HB	1,333	1,333	1,333
CO ₂	0,667	0,667	0,667
H ₂ O	0,667	0,667	0,667
ATP	1,444	1,067	0,533

B) Ruta de succinil-CoA

Especificidad de cofactor	2 etapas de NADH	1 etapa de NADH 1 etapa de NADPH	2 etapas de NADPH
Glucosa	-1,000	-1,000	-1,000
Oxígeno	0,000	0,000	0,000
Protones	1,333	1,333	1,333
4HB	1,333	1,333	1,333
CO ₂	0,667	0,667	0,667

H2O	0,667	0,667	0,667
ATP	0,533	0,000	0,000

C) Ruta de alfa-cetoglutarato

Especificidad de cofactor	1 etapa de NADH	1 etapa de NADPH
Glucosa	-1,000	-1,000
Oxígeno	-0,785	-0,879
Protones	1,159	1,138
4HB	1,159	1,138
CO2	1,364	1,448
H2O	1,364	1,448
ATP	0,000	0,000

5 EJEMPLO IV

Biosíntesis de 1,4-butanodiol a partir de succinato y α -cetoglutarato

Este ejemplo ilustra la construcción y producción biosintética de 4-HB y BDO a partir de organismos microbianos.

10 Tal como se describió anteriormente en los ejemplos I-III, las características termodinámicas de las etapas de biotransformación desde 4-HB hasta BDO mostradas en la figura 1 también se calcularon basándose en la energía libre de Gibbs convencional de formación determinada mediante contribución de grupos. Los resultados se proporcionan en la tabla 5. De manera similar, aunque algunas de las etapas tienen valores de delta G positivos calculados, los errores estándar para estos cálculos y gradientes de concentración indican que cualquiera de las etapas es viable.

15 Tabla 5. Energía libre de Gibbs de reacción (kcal/ml) en condiciones convencionales (valores de pH y fuerza iónica). La temperatura era constante a 298 K. Las barras de error para estos valores son del orden de 8 kcal/mol, tal como se calcula mediante la ecuación 2. Abreviaturas: 4-HBald, 4-hidroxibutiraldehído.

Reacción	ΔG_r°
	pH = 7,0 IS = 0
4-HB + NADH + H+ \rightarrow 4-HBald + NAD	2,4
4-HB + acetil-CoA \rightarrow 4-HB-CoA + acetato	-5,0
4-HB-CoA + NADH + H+ \rightarrow 4-HBald + NAD + CoA	9,5
4-HBald + NADH + H+ \rightarrow bdo + NAD	-5,0

25 Se calcularon los rendimientos teóricos suponiendo que todas las rutas en la figura 2 se incorporan en *E. coli*. Se usó un modelo metabólico a escala del genoma de *E. coli*, similar al descrito en Reed *et al.*, Genome Biol 4: R54 (2003), como base para el análisis. El rendimiento teórico máximo suponiendo neutralidad energética y ausencia de crecimiento o mantenimiento celular fue de 1,09 mol de BDO/mol de glucosa en condiciones microaerobias. En simulaciones realizadas en condiciones anaerobias, que pueden usarse para impulsar la ruta hacia la producción de BDO, se produce o bien acetato o bien etanol como coproducto. En estas condiciones, los rendimientos máximos fueron de 1,04 y 1,00 mol/mol, respectivamente. Una alternativa es añadir cantidades limitantes de nitrato como aceptor de electrones, controlando así la cantidad de respiración que puede producirse. En esta condición, el rendimiento máximo vuelve a 1,09 mol/mol. Otra alternativa es reemplazar la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa de *E. coli* por una fosfoenolpiruvato carboxilasa heteróloga o modificada por ingeniería genética que puede funcionar en el sentido de carboxilación de PEP. Esta enzima produce ATP, mientras que la PEP carboxilasa no. Con esta suposición, el rendimiento máximo vuelve a 1,09 mol/mol.

35 Además, hay varias enzimas alternativas que pueden usarse en la ruta descrita anteriormente. La enzima nativa o endógena para la conversión de succinato en succinil-CoA (etapa 1 en la figura 2) puede reemplazarse por una CoA transferasa tal como la codificada por el gen cat1 de *C. kluyveri* (Sohling, B. y G. Gottschalk, Eur. J Biochem. 212: 121-127 (1993)), que funciona de una manera similar a la etapa 9. Sin embargo, la producción de acetato por esta enzima puede no ser óptima, ya que puede secretarse en vez de convertirse de nuevo en acetil-CoA. En este sentido, también puede ser beneficioso eliminar la formación de acetato en la etapa 9. Como alternativa a esta CoA transferasa, puede emplearse un mecanismo en el que en primer lugar se fosforila el 4-HB mediante ATP y luego se convierte en el derivado de CoA, de manera similar a la ruta de acetato cinasa/fosfotransacetilasa en *E. coli* para la conversión de acetato en acetil-CoA. El coste neto de esta ruta es un ATP, que es lo mismo que se requiere para regenerar acetil-CoA a partir de acetato. Se sabe que las enzimas fosfotransbutirilasa (ptb) y butirato cinasa (bk) llevan a cabo estas etapas en las moléculas no hidroxiladas para la producción de butirato en *C. acetobutylicum* (Cary *et al.*, Appl Environ Microbiol 56:1576-1583 (1990); Valentine, R. C. y R. S. Wolfe, J Biol Chem. 235:1948-1952

(1960)). Estas enzimas son reversibles, permitiendo que la síntesis avance en el sentido de 4-HB.

También puede producirse BDO por medio de α -cetoglutarato además, o en lugar, de a través de succinato. Tal como se describió anteriormente, y se muestra a modo de ejemplo adicionalmente a continuación, una ruta para lograr la biosíntesis del producto es con la producción de semialdehído succínico por medio de α -cetoglutarato usando las enzimas endógenas (figura 2, etapas 4-5). Una alternativa es usar una α -cetoglutarato descarboxilasa que puede realizar esta conversión en una etapa (figura 2, etapa 8; Tian *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 102:10670-10675 (2005)).

10 Para la construcción de diferentes cepas de organismos microbianos productores de BDO, se ensambló una lista de genes aplicables para su corroboración. En resumen, se identificaron uno o más genes dentro de las rutas biosintéticas de 4-HB y/o BDO para cada etapa de la ruta de producción de BDO completa mostrada en la figura 2, usando recursos bibliográficos disponibles, la base de datos genéticos del NCBI y búsquedas de homología. Los genes clonados y evaluados en este estudio se presentan a continuación en la tabla 6, junto con las menciones de URL y referencias apropiadas para la secuencia de polipéptido. Tal como se comenta adicionalmente a 15 continuación, algunos genes se sintetizaron para la optimización de codones mientras que otros se clonaron por medio de PCR a partir del ADN genómico del organismo nativo o de tipo natural. Para algunos genes se usaron ambos enfoques, y en este caso los genes nativos se indican mediante un sufijo "n" en el número de identificación de gen cuando se usan en un experimento. Obsérvese que sólo difieren las secuencias de ADN; las proteínas son 20 idénticas.

Tabla 6. Genes expresados en organismos microbianos productores de BDO huésped.

Número de ID de gen	Número de reacción (figura 1)	Nombre del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	Enlace a la secuencia de la proteína	Referencia
0001	9	Cat2	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1228100	(29)d}
0002	12/13	adhE	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=15004739	(22)d}
0003	12/13	adhE2	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_149325.1	(12)d}
0004	1	Cat1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Succinato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1228100	(29)d}
0008	6	sucD	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Semialdehído succínico deshidrogenasa (dependiente de CoA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1228100	(29)d}
0009	7	4-HBd	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	4-hidroxibutirato deshidrogenasa (dependiente de NAD)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=YP_726053.1	(32)d}
0010	7	4-HBd	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	4-hidroxibutirato deshidrogenasa (dependiente de NAD)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1228100	(29)d}
0011	12/13	adhE	<i>E. coli</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe/c/genes.List.DetailAction.do?fromListFlag=true&featureType=1&orfId=1219	
0012	12/13	yqhD	<i>E. coli</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe/c/genes.List.DetailAction.do	
0013	13	bdhB	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Butanol deshidrogenasa II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349891.1	(35)d}
0020	11	ptb	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Fosfo-transbutirilasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=15896327	(4)d}
0021	10	buk1	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Butirato cinasa I	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137334	(4)d}
0022	10	buk2	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Butirato cinasa II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137415	(4)d}
0023	13	adhEm	aislado de metabiblioteca de consorcios microbianos digestores de aguas residuales anaerobios	Alcohol deshidrogenasa		(37)d}

Número de ID de gen	Número de reacción (figura 1)	Nombre del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	Enlace a la secuencia de la proteína	Referencia
0024	13	adhE	<i>Clostridium thermocellum</i>	Alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cth:Cthe_0423	
0025	13	ald	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Coenzima A-acilante aldehído deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=49036681	(31)d}
0026	13	bdhA	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Butanol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349892.1	(35)d}
0027	12	bld	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	Butiraldehído deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=31075383	(18)d}
0028	13	bdh	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	Butanol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=124221917	(18)d}
0029	12/13	adhE	<i>Clostridium tetani</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ctc:CTC01366	
0030	12/13	adhE	<i>Clostridium perfringens</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpe:CPE2531	
0031	12/13	adhE	<i>Clostridium difficile</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cdf:CD2966	
0032	8	sucA	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG, Pasteur	α -cetoglutarato descarboxilasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=YP_977400.1	(30)d}
0033	9	cat2	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	4-hidroxitirato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=6249316	
0034	9	cat2	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	4-hidroxitirato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=34541558	
0035	6	sucD	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	Semialdehído succínico deshidrogenasa (dependiente de CoA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904963.1	
0036	7	4-HBd	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	4-hidroxitirato deshidrogenasa dependiente de NAD	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904964.1	
0037	7	gbd	Bacteria no cultivada	4-hidroxitirato deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=5916168	(16)d}
0038	1	sucCD	E. coli	Succinil-CoA sintetasa	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe/c/genes.List.DetailAction.do	

Construcción del vector de expresión para la ruta de BDO. Se obtuvieron estructuras principales de vector y algunas cepas del Dr. Rolf Lutz de Expressys (www.expressys.de/). Los vectores y las cepas se basan en el sistema de expresión pZ desarrollado por el Dr. Rolf Lutz y el Prof. Hermann Bujard (Lutz, R. y H. Bujard, *Nucleic Acids Res* 25: 1203-1210 (1997)). Los vectores obtenidos eran pZE13luc, pZA33luc, pZS*13luc y pZE22luc y contenían el gen de luciferasa como fragmento de relleno. Para reemplazar el fragmento de relleno de luciferasa por un fragmento de lacZ-alfa flanqueado por sitios de enzimas de restricción apropiados, se retiró en primer lugar el fragmento de relleno de luciferasa de cada vector mediante digestión con EcoRI y XbaI. Se amplificó por PCR el fragmento de lacZ-alfa a partir de pUC19 con los siguientes cebadores:

lacZalfa-RI

5'GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCAGTCCGTCGTTTTAC3'

lacZalfa 3'BB

5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'.

5 Esto generó un fragmento con un extremo en 5' de sitio EcoRI, sitio NheI, un sitio de unión a ribosoma, un sitio Sall y el codón de iniciación. En el extremo 3' del fragmento estaba contenido el codón de terminación, sitios XbaI, HindIII y AvrII. Se digirió el producto de PCR con EcoRI y AvrII y se ligó en 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 enzimas de restricción NheI y XbaI generan extremos compatibles que pueden ligarse entre sí (pero generan un no sitio NheI/XbaI que no se digiere por ninguna de las enzimas), los genes clonados en los vectores pueden unirse mediante la técnica de "bioladrillos" (*Biobricks*) entre sí (http://openwetware.org/wiki/Synthetic_Biology:BioBricks). En resumen, este método permite la unión de un número ilimitado de genes en el vector usando los mismos 2 sitios de restricción (siempre que los sitios no aparezcan internos a los genes), porque los sitios entre los genes se destruyen tras cada adición.

15 Todos los vectores tienen la designación pZ seguida por letras y números que indican el origen de replicación, el marcador de resistencia a antibióticos y la unidad promotora/reguladora. El origen de replicación es la segunda letra y se indica mediante E para orígenes basados en ColE1, A para p15A y S para pSC101. El primer número representa el marcador de resistencia a antibióticos (1 para ampicilina, 2 para kanamicina, 3 para cloranfenicol, 4 para espectinomicina y 5 para tetraciclina). El número final define el promotor que regulaba el gen de interés (1 para P_{LtetO-1}, 2 para P_{LlacO-1}, 3 para P_{AllacO-1} y 4 para P_{lac/ara-1}). Siguen inmediatamente después el MCS y el gen de interés. Para el trabajo comentado en este caso se emplearon dos vectores de base, pZA33 y pZE13, modificados para las inserciones de bioladrillos tal como se comentó anteriormente. Una vez clonado(s) el/los gen(es) de interés en los mismos, se indican los plásmidos resultantes usando los códigos de genes de cuatro dígitos facilitados en la tabla 6; por ejemplo, pZA33-XXXX-YYYY-....

25 Construcción de la cepa huésped. La cepa original en todos los estudios descritos en el presente documento es la cepa MG1655 de *E. coli* K-12. Se construyeron cepas de delección sin marcador en *adhE*, *gabD* y *aldA* bajo contrato de servicio por un tercero usando el método de redET (Datsenko, K. A. y B. L. Wanner, Proc Natl Acad Sci USA 97:6640-6645 (2000)). Se construyeron cepas posteriores por medio de transducción mediada por bacteriófago P1 (Miller, J. 1973. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York). Se obtuvo la cepa C600Z1 (*lacI^q*, PN25-tetR, Sp^R, *lacY1*, *leuB6*, *mcrB+*, *supE44*, *thi-1*, *thr-1*, *tonA21*) de Expressys y se usó como fuente de un alelo *lacI^q* para la transducción de P1. Se hizo crecer el bacteriófago P1vir en la cepa de *E. coli* C600Z1, que tiene el gen de resistencia a espectinomicina unido al *lacI^q*. Se usó el lisado de P1 hecho crecer en C600Z1 para infectar MG1655 con selección para resistencia a espectinomicina. Entonces se examinaron las colonias resistentes a espectinomicina para detectar el *lacI^q* unido determinando la capacidad de los transductantes para reprimir la expresión de un gen unido a un promotor P_{AllacO-1}. La cepa resultante se designó MG1655 *lacI^q*. Se usó un procedimiento similar para introducir *lacI^q* en las cepas de delección.

40 Producción de 4-HB a partir de succinato. Para la construcción de un productor de 4-HB a partir de succinato, se ensamblaron genes que codifican para las etapas desde succinato hasta 4-HB y 4-HB-CoA (1, 6, 7 y 9 en la figura 2) en los vectores pZA33 y pZE13 tal como se describe a continuación. Se evaluaron diversas combinaciones de genes, así como constructos que portaban rutas incompletas como controles (tablas 7 y 8). Entonces se transformaron los plásmidos en cepas huésped que contenían *lacI^q*, lo que permite la expresión inducible mediante la adición de β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG). Se sometieron a prueba tanto el tipo natural como los huéspedes con delecciones en genes que codifican para la semialdehído succínico deshidrogenasa nativa (etapa 2 en la figura 1).

50 En primer lugar se sometió a prueba la actividad de las enzimas heterólogas en ensayos *in vitro*, usando la cepa MG1655 *lacI^q* como huésped para los constructos de plásmido que contenían los genes de la ruta. Se hicieron crecer las células de manera aerobia en medios LB (Difco) que contenían los antibióticos apropiados para cada constructo, y se indujeron mediante la adición de IPTG a 1 mM cuando la densidad óptica (DO600) alcanzó aproximadamente 0,5. Se recogieron las células tras 6 horas, y se realizaron ensayos enzimáticos tal como se comenta a continuación.

55 Ensayos enzimáticos *in vitro*. Para obtener extractos en bruto para los ensayos de actividad, se recogieron células mediante centrifugación a 4.500 rpm (Beckman-Coulter, Allegra X-15R) durante 10 min. Se resuspendieron los sedimentos en 0,3 ml de reactivo BugBuster (Novagen) con benzonasa y lisozima, y la lisis avanzó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se obtuvo el lisado libre de células mediante centrifugación a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5402) durante 30 min a 4°C. Se determinó la proteína celular en la muestra usando el método de Bradford *et al.*, Anal. Biochem. 72:248-254 (1976), y se realizaron ensayos enzimáticos específicos tal como se describe a continuación. Las actividades se notifican en unidades/mg de proteína, en las que una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para convertir 1 μmol de sustrato en 1 min a temperatura ambiente. En general, los valores notificados son promedios de al menos 3 ensayos repetidos.

65 Se determinó la actividad succinil-CoA transferasa (Cat1) monitorizando la formación de acetil-CoA a partir de succinil-CoA y acetato, siguiendo un procedimiento descrito previamente, Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996). Se determinó la actividad succinil-CoA sintetasa (SucCD) siguiendo la formación de succinil-CoA a partir

de succinato y CoA en presencia de ATP. El experimento siguió un procedimiento descrito por Cha y Parks, J. Biol. Chem. 239:1961-1967 (1964). Se determinó la actividad succinato semialdehído deshidrogenasa (SucD) dependiente de CoA siguiendo la conversión de NAD en NADH a 340 nm en presencia de succinato semialdehído y CoA (Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993)). Se determinó la actividad enzimática de 4-HB deshidrogenasa (4-HBd) monitorizando la oxidación de NADH para dar NAD a 340 nm en presencia de succinato semialdehído. El experimento siguió un procedimiento publicado, Gerhardt *et al.* Arch. Microbiol. 174:189-199 (2000). Se determinó la actividad 4-HB CoA transferasa (Cat2) usando un procedimiento modificado a partir de Scherf y Buckel, Appl. Environ. Microbiol. 57:2699-2702 (1991). Se determinó la formación de 4-HB-CoA o butiril-CoA a partir de acetil-CoA y 4-HB o butirato usando HPLC.

Se sometieron a ensayo alcohol (ADH) y aldehído (ALD) deshidrogenasa en el sentido reductor usando un procedimiento adaptado a partir de varias fuentes de bibliografía (Durre *et al.*, FEMS Microbiol. Rev. 17:251-262 (1995); Palosaari y Rogers, J. Bacteriol. 170:2971-2976 (1988) y Welch *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 273:309-318 (1989)). La oxidación de NADH se sigue leyendo la absorbancia a 340 nM cada cuatro segundos durante un total de 240 segundos a temperatura ambiente. Se realizaron ensayos reductores en MOPS 100 mM (ajustado a pH 7,5 con KOH), NADH 0,4 mM y desde 1 hasta 50 μ l de extracto celular. Se inicia la reacción añadiendo los siguientes reactivos: 100 μ l de acetaldehído o butiraldehído 100 mM para ADH, o 100 μ l de acetil-CoA o butiril-CoA 1 mM para ALD. Se calibra rápidamente con blanco del espectrofotómetro y entonces se inicia la lectura cinética. La pendiente resultante de la reducción de la absorbancia a 340 nM por minuto, junto con el coeficiente de extinción molar de NAD(P)H a 340 nM (6000) y la concentración de proteína del extracto, pueden usarse para determinar la actividad específica.

La actividad enzimática de PTB se mide en el sentido de butiril-CoA a butiril-fosfato tal como se describe en Cary *et al.* J. Bacteriol. 170:4613-4618 (1988). Proporciona fosfato inorgánico para la conversión, y sigue el aumento en CoA libre con el reactivo 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico), o DTNB. DTNB reacciona rápidamente con grupos tiol tales como CoA libre liberando el ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico (TNB) de color amarillo, que absorbe a 412 nm con un coeficiente de extinción molar de 14,140 M cm^{-1} . El tampón de ensayo contenía fosfato de potasio 150 mM a pH 7,4, DTNB 0,1 mM y butiril-CoA 0,2 mM, y se inició la reacción mediante la adición de 2 a 50 μ l de extracto celular. Se mide la actividad enzimática de BK en el sentido de formación de butirato a butiril-fosfato a expensas de ATP. El procedimiento es similar al ensayo para acetato cinasa descrito previamente, Rose *et al.*, J. Biol. Chem. 211:737-756 (1954). Sin embargo, se ha encontrado que otro protocolo de ensayo enzimático de acetato cinasa proporcionado por Sigma es más útil y sensible. Este ensayo vincula la conversión de ATP en ADP por acetato cinasa a la conversión vinculada de ADP y fosfoenol piruvato (PEP) en ATP y piruvato por piruvato cinasa, seguido por la conversión de piruvato y NADH en lactato y NAD⁺ por lactato deshidrogenasa. La sustitución de butirato por acetato es la única modificación importante para permitir que el ensayo siga la actividad enzimática de BK. La mezcla de ensayo contenía tampón trietanolamina 80 mM a pH 7,6, butirato de sodio 200 mM, MgCl₂ 10 mM, NADH 0,1 mM, ATP 6,6 mM, fosfoenolpiruvato 1,8 mM. Se añadieron piruvato cinasa, lactato deshidrogenasa y miocinasa según las instrucciones del fabricante. Se inició la reacción añadiendo de 2 a 50 μ l de extracto celular, y se monitorizó la reacción basándose en la disminución de la absorbancia a 340 nm que indica oxidación de NADH.

Análisis de derivados de CoA mediante HPLC. Se desarrolló un ensayo basado en HPLC para monitorizar reacciones enzimáticas que implican transferencia de coenzima A (CoA). El método desarrollado permitió la caracterización de la actividad enzimática mediante determinación cuantitativa de CoA, acetil CoA (AcCoA), butiril CoA (BuCoA) y 4-hidroxibutirato CoA (4-HBCoA) presentes en mezclas de reacción *in vitro*. Se logró una sensibilidad de hasta pocos μ M, así como resolución excelente de todos los derivados de CoA de interés.

Se realizó la preparación de productos químicos y de muestra tal como sigue. En resumen, CoA, AcCoA, BuCoA y todos los demás productos químicos, se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Los disolventes, metanol y acetonitrilo, eran de calidad para HPLC. Las curvas de calibración patrón mostraron linealidad excelente en el intervalo de concentración de 0,01-1 mg/ml. Las mezclas de reacción enzimática contenían tampón Tris HCl 100 mM (pH 7), se tomaron alícuotas en diferentes puntos de tiempo, se extinguieron con ácido fórmico (concentración final del 0,04%) y se analizaron directamente mediante HPLC.

Se realizó el análisis de HPLC usando un sistema de HPLC 1100 de Agilent equipado con una bomba binaria, desgasificador, inyector automático con termostato y compartimento de columna y se usó detector de red de diodos (DAD) para el análisis. Se empleó una columna de fase inversa, Kromasil 100 5 μ m C18, 4,6x150 mm (Peeke Scientific). Se usaron fosfato de potasio 25 mM (pH 7) y metanol o acetonitrilo, como disolventes acuosos y orgánicos a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se desarrollaron dos métodos: uno corto con un gradiente más rápido para el análisis de CoA, AcCoA y BuCoA bien resueltos, y un método más largo para distinguir entre AcCoA y 4-HBCoA que eluyen muy próximos. El método corto empleó gradiente de acetonitrilo (0 min - 5%, 6 min - 30%, 6,5 min - 5%, 10 min - 5%) y dio como resultado los tiempos de retención de 2,7, 4,1 y 5,5 min para CoA, AcCoA y BuCoA, respectivamente. En el método largo se usó metanol con el siguiente gradiente lineal: 0 min - 5%, 20 min - 35%, 20,5 min - 5%, 25 min - 5%. Los tiempos de retención para CoA, AcCoA, 4-HBCoA y BuCoA eran de 5,8, 8,4, 9,2 y 16,0 min, respectivamente. El volumen de inyección era de 5 μ l, la temperatura de columna de 30°C y se monitorizó la absorbancia UV a 260 nm.

Los resultados demostraron la actividad de cada una de las cuatro etapas de ruta (tabla 6), aunque la actividad depende claramente de la fuente del gen, posición del gen en el vector y el contexto de otros genes con los que se expresa. Por ejemplo, el gen 0035 codifica para una semialdehído succínico deshidrogenasa que es más activa que la codificada por 0008, y 0036 y 0010n son genes más activos para 4-HB deshidrogenasa que 0009. También parece haber mejor actividad 4-HB deshidrogenasa cuando hay otro gen que precede al mismo en el mismo operón.

Tabla 7. Actividades enzimáticas *in vivo* en extractos celulares a partir de MG1655 *lacI*^Q que contiene los plásmidos que expresan los genes en la ruta de 4-HB-CoA. La actividades se notifican en unidades/mg de proteína, en las que una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para convertir 1 μ mol de sustrato en 1 min a temperatura ambiente.

n.º de muestra	pZE13 (a)	pZA33 (b)	DO600	Prot. celular (c)	Cat1	SucD	4HBd	Cat2
1	cat1 (0004)		2,71	6,43	1,232	0,00		
2	cat1 (0004)-sucD (0035)		2,03	5,00	0,761	2,57		
3	cat1 (0004)-sucD (0008)		1,04	3,01	0,783	0,01		
4	sucD (0035)		2,31	6,94		2,32		
5	sucD (0008)		1,10	4,16		0,05		
6		4hbd (0009)	2,81	7,94	0,003		0,25	
7		4hbd (0036)	2,63	7,84			3,31	
8		4hbd (0010n)	2,00	5,08			2,57	
9	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	2,07	5,04	0,600	1,85	0,01	
10	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	2,08	5,40	0,694	1,73	0,41	
11	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	2,44	4,73	0,679	2,28	0,37	
12	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	1,08	3,99	0,572	-0,01	0,02	
13	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0,77	2,60	0,898	-0,01	0,04	
14	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0,63	2,47	0,776	0,00	0,00	
15		cat2 (0034)	2,56	7,86				1,283
16		cat2(0034)-4hbd(0036)	3,13	8,04			24,86	0,993
17		cat2(0034)-4hbd(0010n)	2,38	7,03			7,45	0,675
18		4hbd(0036)-cat2(0034)	2,69	8,26			2,15	7,490
19		4hbd(0010n)-cat2(0034)	2,44	6,59			0,59	4,101

Genes expresados a partir de Plac en pZE13, un plásmido de número de copias alto con origen de *colE1* y resistencia a ampicilina. Los números de identificación de gen son tal como se facilitan en la tabla 2.

Genes expresados a partir de Plac en pZA33, un plásmido de número de copias medio con origen de *pACYC* y resistencia a cloranfenicol.

(c) Proteína celular facilitada como mg de proteína por ml de extracto.

Entonces se evaluaron las cepas recombinantes que contenían genes en la ruta de 4-HB para determinar la capacidad para producir 4-HB *in vivo* a partir de productos intermedios metabólicos fundamentales. Se hicieron crecer células de manera anaerobia en medio LB hasta una DO600 de aproximadamente 0,4, entonces se indujeron con IPTG 1 mM. Una hora más tarde, se añadió succinato de sodio hasta 10 mM, y se tomaron muestras para el análisis tras 24 y 48 horas adicionales. Se analizó 4-HB en el caldo de cultivo mediante CG-EM tal como se describe a continuación. Los resultados indican que la cepa recombinante puede producir más de 4-HB 2 mM tras 24 horas, en comparación con esencialmente cero en la cepa control (tabla 8).

Tabla 8. Producción de 4-HB a partir de succinato en cepas de *E. coli* que albergan plásmidos que expresan diversas combinaciones de genes de la ruta de 4-HB.

N.º de muestra	Cepa huésped	pZE13	pZA33	24 horas			48 horas		
				DO600	4HB, μ M	4HB norm.(a)	DO600	4HB, μ M	4HB norm. (a)
1	MG1655 <i>lacI</i> ^Q	cat1 (0004)-sucD (0035)	4had(0009)	0,47	487	1036	1,04	1780	1711
2	MG1655	cat1 (0004)-	4hbd (027)	0,41	111	270	0,99	214	217

	laclq	sucD (0035)							
3	MG1655 laclq	cat1 (0004)- sucD (0035)	4hbd(0036)	0,47	863	1835	0,48	2152	4484
4	MG1655 laclq	cat1 (0004)- sucD (0035)	4hbd(0010n)	0,46	956	2078	0,49	2221	4533
5	MG1655 laclq	cat1 (0004)- sucD (0008)	4had(0009)	0,38	493	1296	0,37	1338	3616
6	MG1655 laclq	cat1 (0004)- sucD (0008)	4hbd(0027)	0,32	26	81	0,27	87	323
7	MG1655 laclq	cat1 (0004)- sucD (0008)	4hbd (0036)	0,24	506	2108	0,31	1448	4672
8	MG1655 laclq	cat1 (0004)- sucD (0008)	4hbd (0010n)	0,24	78	324	0,56	233	416
9	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)- sucD (0035)	4hbd (0009)	0,53	656	1237	1,03	1643	1595
10	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)- sucD (0035)	4hbd (0027)	0,44	92	209	0,98	214	218
11	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)- sucD (0035)	4hbd (0036)	0,51	1072	2102	0,97	2358	2431
12	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)- sucD (0035)	4hbd (0010n)	0,51	981	1924	0,97	2121	2186
13	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)- sucD (0008)	4hbd(0009)	0,35	407	1162	0,77	1178	1530
14	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)- sucD (0008)	4hbd(0027)	0,51	19	36	1,07	50	47
15	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)- sucD (0008)	4hbd(0036)	0,35	584	1669	0,78	1350	1731
16	MG1655 laclq gabd	cat1 (0004)- sucD (0008)	4hbd(0010n)	0,32	74	232	0,82	232	283
17	MG1655 laclq	sólo vector	sólo vector	0,8	1	2	1,44	3	2
18	MG1655 laclq gabD	sólo vector	sólo vector	0,89	1	2	1,41	7	5

(a) Concentración de 4-HB normalizada, μM /unidades de DO600

Una alternativa al uso de una CoA transferasa (cat1) para producir succinil-CoA a partir de succinato es usar los genes sucCD de *E. coli* nativos, que codifican para succinil-CoA sintetasa. Se clonó esta agrupación génica en pZ13 junto con genes candidatos para las etapas restantes para dar 4-HB para crear pZE13-0038-0035-0036.

5 Producción de 4-HB a partir de glucosa. Aunque los experimentos anteriores demuestran una ruta funcional para dar 4-HB a partir de un producto intermedio metabólico fundamental (succinato), un procedimiento industrial requerirá la producción de productos químicos a partir de materias primas de hidrato de carbono de bajo coste tales como glucosa o sacarosa. Por tanto, el siguiente conjunto de experimentos estaba dirigido a determinar si el succinato endógeno producido por las células durante el crecimiento en glucosa podía alimentar la ruta de 4-HB. Se hicieron crecer células de manera anaerobia en medio mínimo M9 (Na_2HPO_4 6,78 g/l, KH_2PO_4 3,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH_4Cl 1,0 g/l, MgSO_4 1 mM, CaCl_2 0,1 mM) complementado con glucosa 20 g/l, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 100 mM para mejorar la capacidad tamponante, tiamina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y los antibióticos apropiados. Se añadió IPTG 0,25 mM cuando la DO600 alcanzó aproximadamente 0,2, y se tomaron muestra para el análisis de 4-HB cada 15 24 horas tras la inducción. En todos los casos 4-HB formó una meseta tras 24 horas, con un máximo de aproximadamente 1 mM en las mejores cepas (figura 11a), mientras que la concentración de succinato siguió aumentando (figura 11b). Esto indica que el suministro de succinato a la ruta probablemente no es limitativo, y que el cuello de botella puede estar en la actividad de las propias enzimas o en la disponibilidad de NADH. 0035 y 0036 son claramente los mejores candidatos génicos para semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y 4-HB deshidrogenasa, respectivamente. La eliminación de uno o ambos genes que codifican semialdehído succínico deshidrogenasas nativas conocida (gabD) o supuesta (aldA) tenía poco efecto sobre el rendimiento. Finalmente, debe observarse que las células crecieron hasta una DO mucho menor en las cepas productoras de 4-HB que en los controles (figura 11c).

25 Una ruta alternativa para la producción de 4-HB a partir de glucosa es por medio de α -cetoglutarato. Se exploró el uso de una α -cetoglutarato descarboxilasa a partir de *Mycobacterium tuberculosis*, Tian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 10670-10675 (2005) para producir semialdehído succínico directamente a partir de α -cetoglutarato (etapa 8 en la figura 2). Para demostrar que este gen (0032) era funcional *in vivo*, se expresó en pZ13 en el mismo huésped que 4-HB deshidrogenasa (gen 0036) en pZA33. Esta cepa podía producir más de 4-HB 1,0 mM en un plazo de 30 24 horas tras la inducción con IPTG 1 mM (figura 12). Puesto que esta cepa no expresa una semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, se elimina la posibilidad de producción de semialdehído succínico por medio

de succinil-CoA. También es posible que los genes nativos responsables de la producción de semialdehído succínico puedan funcionar en esta ruta (etapas 4 y 5 en la figura 2); sin embargo, la cantidad de 4-HB producido cuando el plásmido pZE13-0032 se dejó fuera del huésped es insignificante.

5 Producción de BDO a partir de 4-HB. La producción de BDO a partir de 4-HB requirió dos etapas de reducción, catalizadas por deshidrogenasas. Alcohol y aldehído deshidrogenasas (ADH y ALD, respectivamente) son enzimas dependientes de NAD⁺/H y/o NADP⁺/H que juntas pueden reducir un grupo ácido carboxílico en una molécula para dar un grupo alcohol, o a la inversa, puede realizar la oxidación de un alcohol para dar un ácido carboxílico. Esta biotransformación se ha demostrado en *Clostridium acetobutylicum* de tipo natural (Jewell *et al.*, Current Microbiology, 13:215-19 (1986)), pero no se identificaron ni las enzimas responsables ni los genes responsables. Además, se desconoce si se requiere en primer lugar la activación para dar 4-HB-CoA (etapa 9 en la figura 2), o si la aldehído deshidrogenasa (etapa 12) puede actuar directamente sobre 4-HB. Se desarrolló una lista de enzimas candidatas a partir de *C. acetobutylicum* y organismos relacionados basándose en la actividad conocida con los análogos no hidroxilados para dar 4-HB y productos intermedios de la ruta, o por similitud con los genes caracterizados (tabla 6). Puesto que algunos de los candidatos son deshidrogenasas multifuncionales, posiblemente podrían catalizar tanto la reducción dependiente de NAD(P)H del ácido (o derivado de CoA) para dar el aldehído, como del aldehído para dar el alcohol. Antes de empezar a trabajar con estos genes en *E. coli*, en primer lugar se validó el resultado al que se hizo referencia anteriormente usando *C. acetobutylicum* ATCC 824. Se hicieron crecer células en caldo Schaedler (Accumedia, Lansing, MI) complementado con 4-HB 10 mM, en una atmósfera anaerobia de CO₂ al 10%, H₂ al 10% y N₂ al 80% a 30°C. Se tomaron muestras de cultivo periódicas, se centrifugaron y se analizó el caldo para determinar BDO mediante CG-EM tal como se describe a continuación. Se detectaron concentraciones de BDO de 0,1 mM, 0,9 mM y 1,5 mM tras 1 día, 2 días y 7 días de incubación, respectivamente. No se detectó BDO en cultivo hecho crecer sin adición de 4-HB. Para demostrar que el BDO producido se derivaba a partir de glucosa, se hizo crecer la mejor cepa productora de BDO, MG1655 lacI^Q pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036, en medio mínimo M9 complementado con glucosa marcada uniformemente con ¹³C 4 g/l. Se indujeron las células a DO de 0,67 con IPTG 1 mM, y se tomó una muestra tras 24 horas. Se realizó el análisis del sobrenadante de cultivo mediante espectrometría de masas.

A continuación se sometieron a prueba candidatos génicos para la ruta de conversión de 4-HB en BDO para determinar la actividad cuando se expresaban en el huésped de *E. coli* MG1655 lacI^Q. Se hicieron crecer cepas recombinantes que contenían cada candidato génico expresado en pZA33 en presencia de IPTG 0,25 mM durante cuatro horas a 37°C para inducir completamente la expresión de la enzima. Cuatro horas tras la inducción, se recogieron las células y se sometieron a ensayo para determinar la actividad de ADH y ALD tal como se describió anteriormente. Puesto que 4-HB-CoA y 4-hidroxibutiraldehído no están disponibles comercialmente, se realizaron ensayos usando los sustratos no hidroxilados (tabla 9). La razón de la actividad entre sustratos de 4 carbonos y 2 carbonos para *C. acetobutylicum adhE2* (0002) y *E. coli adhE* (0011) eran similares a las indicadas previamente en la bibliografía Atsumi *et al.*, Biochim. Biophys. Acta. 1207:1-11 (1994).

Tabla 9. Actividades enzimáticas *in vitro* en extractos celulares a partir de MG1655 lacI^Q que contenía pZA33 que expresan candidatos génicos para las aldehído y alcohol deshidrogenasas. Las actividades se expresan en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína celular⁻¹. N.D., no determinado

Gen	Sustrato	Aldehído deshidrogenasa		Alcohol deshidrogenasa	
		Butiril-CoA	Acetil-CoA	Butiraldehído	Acetaldehído
0002		0,0076	0,0046	0,0264	0,0247
0003n		0,0060	0,0072	0,0080	0,0075
0011		0,0069	0,0095	0,0265	0,0093
0013		N.D.	N.D.	0,0130	0,0142
0023		0,0089	0,0137	0,0178	0,0235
0025		0	0,0001	N.D.	N.D.
0026		0	0,0005	0,0024	0,0008

Para los experimentos de producción de BDO, se incluyó cat2 de *Porphyromonas gingivalis* W83 (gen 0034) en pZA33 para la conversión de 4-HB en 4-HB-CoA, mientras que los genes de deshidrogenasa candidatos se expresaron en pZE13. La cepa huésped era MG1655 lacI^Q. Junto con los candidatos de alcohol y aldehído deshidrogenasa, también se sometió a prueba la capacidad de semialdehído succínico deshidrogenasas dependientes de CoA (sucD) para funcionar en esta etapa, debido a la similitud de los sustratos. Se hicieron crecer células hasta una DO de aproximadamente 0,5 en medio LB complementado con 4-HB 10 mM, inducidas con IPTG 1 mM, y se tomaron muestras de caldo de cultivo tras 24 horas y se analizaron para determinar el BDO tal como se describe a continuación. La mejor producción de BDO se produjo usando adhE2 a partir de *C. acetobutylicum*, sucD a partir de *C. kluyveri*, o sucD a partir *P. gingivalis* (figura 13). De manera interesante, la cantidad absoluta de BDO producida era mayor en condiciones aerobias; sin embargo, esto se debe principalmente a la menor densidad celular alcanzada en cultivos anaerobios. Cuando se normaliza con respecto a la DO de la célula, la producción de BDO por biomasa unitaria es mayor en condiciones anaerobias (tabla 10).

Tabla 10. Concentraciones de BDO absolutas y normalizadas a partir de cultivos de células que expresan adhE2 a partir de *C. acetobutylicum*, sucD partir de *C. kluyveri*, o sucD partir de *P. gingivalis* (datos de los experimentos 2, 9 y 10 en la figura 11), así como el control negativo (experimento 1).

Gen expresado	Condiciones	BDO (μM)	DO (600 nm)	BDO/DO
ninguno	Aerobia	0	13,4	0
ninguno	Microaerobia	0,5	6,7	0,09
ninguno	Anaerobia	2,2	1,26	1,75
0002	Aerobia	138,3	9,12	15,2
0002	Microaerobia	48,2	5,52	8,73
0002	Anaerobia	54,7	1,35	40,5
0008n	Aerobia	255,8	5,37	47,6
0008n	Microaerobia	127,9	3,05	41,9
0008n	Anaerobia	60,8	0,62	98,1
0035	Aerobia	21,3	14,0	1,52
0035	Microaerobia	13,1	4,14	3,16
0035	Anaerobia	21,3	1,06	20,1

5 Tal como se trata en la sección 2, puede ser ventajoso usar una ruta para convertir 4-HB en 4-HB-CoA que no genere acetato como subproducto. Para este fin, se sometió a prueba el uso de fosfotransbutirilasa (ptb) y butirato cinasa (bk) de *C. acetobutylicum* para llevar a cabo esta conversión por medio de las etapas 10 y 11 en la figura 2. Se clonó el operón ptb/bk nativo de *C. acetobutylicum* (genes 0020 y 0021) y se expresó en pZA33. Se tomaron extractos a partir de células que contenían el constructo resultante y se sometieron a ensayo para determinar las dos actividades enzimáticas tal como se describe en el presente documento. La actividad específica de BK era de aproximadamente 65 U/mg, mientras que la actividad específica de PTB era de aproximadamente 5 U/mg. Una unidad (U) de actividad se define como la conversión de sustrato 1 μM en 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se sometió a prueba el constructo para determinar la participación en la conversión de 4-HB en BDO. Se transformaron cepas huésped con el constructo pZA33-0020-0021 descrito y pZ13-0002, y se compararon con el uso de cat2 en la producción de BDO usando el procedimiento aeróbico usado anteriormente en la figura 13. La cepa BK/PTB produjo BDO 1 mM, en comparación con 2 mM cuando se usó cat2 (tabla 11). De manera interesante, los resultados dependían de si la cepa huésped contenía una delección en el gen adhE nativo.

20 Tabla 11. Concentraciones de BDO absolutas y normalizadas a partir de cultivos de células que expresan adhE2 a partir de *C. acetobutylicum* en pZ13 junto con o bien cat2 de *P. gingivalis* (0034) o bien los genes PTB/BK de *C. acetobutylicum* en pZA33. Las cepas huésped eran o bien MG1655 lacI^Q o bien MG1655 ΔadhE lacI^Q

Genes	Cepa huésped	BDO (μM)	DO (600 nm)	BDO/DO
0034	MG1655 lacI ^Q	0,827	19,9	0,042
0020+0021	MG1655 lacI ^Q	0,007	9,8	0,0007
0034	MG1655 ΔadhE lacI ^Q	2,084	12,5	0,166
0020+0021	MG1655 ΔadhE lacI ^Q	0,975	18,8	0,052

25 Producción de BDO a partir de glucosa. La etapa final de la corroboración de la ruta es expresar los segmentos tanto 4-HB como BDO de la ruta en *E. coli* y demostrar la producción de BDO en medio mínimo de glucosa. Se construyeron plásmidos nuevos de manera que todos los genes requeridos caben en dos plásmidos. En general, se expresaron los genes cat1, adhE y sucD a partir de pZE13 y se expresaron cat2 y 4-HBd a partir de pZA33. Se sometieron a prueba diversas combinaciones de fuente génica y orden génico en el contexto de MG1655 lacI^Q. Se hicieron crecer células de manera anaerobia en medio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 6,78 g/l, KH₂PO₄ 3,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1,0 g/l, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM) complementado con glucosa 20 g/l, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 100 mM para mejorar la capacidad tamponante, tiamina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y los antibióticos apropiados. Se añadió IPTG 0,25 mM aproximadamente 15 horas tras la inoculación y se tomaron muestras de sobrenadante de cultivo para análisis de BDO, 4-HB y succinato 24 y 48 horas tras la inducción. La producción de BDO pareció mostrar una dependencia del orden génico (tabla 12). Se obtuvo la mayor producción de BDO, más de 0,5 mM, expresándose en primer lugar cat2, seguido por 4-HBd en pZA33, y cat1 seguido por sucD de *P. gingivalis* en pZ13. La adición de adhE2 de *C. acetobutylicum* en la última posición en pZE13 dio como resultado una ligera mejora. También se produjeron 4-HB y succinato a concentraciones más altas.

40 Tabla 12. Producción de BDO, 4-HB y succinato en cepas de *E. coli* recombinantes que expresan combinaciones de genes de la ruta de BDO, que se hacen crecer en medio mínimo complementado con glucosa 20 g/l. Las concentraciones se facilitan en mM.

Muestras	pZE13	pZA33	DO de inducción	24 horas				48 horas			
				DO 600 nm	Su	4HB	BDO	DO 600 nm	Su	4HB	BDO

1	cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,92	1,29	5,44	1,37	0,240	1,24	6,42	1,49	0,280
2	cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,36	1,11	6,90	1,24	0,011	1,06	7,63	1,33	0,011
3	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,20	0,44	0,34	1,84	0,050	0,60	1,93	2,67	0,119
4	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1,31	1,90	9,02	0,73	0,073	1,95	9,73	0,82	0,077
5	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,17	0,45	1,04	1,04	0,008	0,94	7,13	1,02	0,017
6	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1,30	1,77	10,47	0,25	0,004	1,80	11,49	0,28	0,003
7	cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1,09	1,29	5,63	2,15	0,461	1,38	6,66	2,30	0,520
8	cat1(0004)-suCD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1,81	2,01	11,28	0,02	0,000	2,24	11,13	0,02	0,000
9	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0,24	1,99	2,02	2,32	0,106	0,89	4,85	2,41	0,186
10	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0,98	1,17	5,30	2,08	0,569	1,33	6,15	2,14	0,640
11	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0,20	0,53	1,38	2,30	0,019	0,91	8,10	1,49	0,034
12	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	2,14	2,73	12,07	0,16	0,000	3,10	11,79	0,17	0,002
13	sólo vector	sólo vector	2,11	2,62	9,03	0,01	0,000	3,00	12,05	0,01	0,000

Análisis de BDO, 4-HB y succinato mediante CG-EM. Se derivatizaron BDO, 4-HB y succinato en muestras de cultivo celular y fermentación mediante sililación y se analizaron cuantitativamente mediante CG-EM usando métodos adaptados a partir de informes de la bibliografía ((Simonov *et al.*, J. Anal Chem. 59: 965-971 (2004)). El método desarrollado demostró buena sensibilidad hasta 1 μ M, linealidad hasta al menos 25 mM, así como selectividad y reproducibilidad excelentes.

Se realizó la preparación de la muestra tal como sigue: se secaron 100 μ l de muestras filtradas (filtros de jeringa de 0,2 μ m o 0,45 μ m), por ejemplo caldo de fermentación, cultivo celular o disoluciones patrón, en un aparato Speed Vac Concentrator (Savant SVC-100H) durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiental, seguido por la adición de 20 μ l de disolución de ciclohexanol 10 mM, como patrón interno, en dimetilformamida. Se agitaron mediante vórtex las mezclas y se sonicaron en un baño de agua (Branson 3510) durante 15 min para garantizar la homogeneidad. Se añadieron 100 μ l de reactivo de derivatización de sililación, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro-acetimida (BSTFA) con el 1% de trimetilclorosilano, y se incubó la mezcla a 70°C durante 30 min. Se centrifugaron las muestras derivatizadas durante 5 min, y se inyectaron las disoluciones transparentes directamente en CG-EM. Todos los productos químicos y reactivos eran de Sigma-Aldrich, con la excepción de BDO que se adquirió de J.T.Baker.

Se realizó CG-EM en un cromatógrafo de gases 6890N de Agilent, conectado con un detector selectivo de masas (MSD) 5973N que se hizo funcionar en el modo de ionización de impacto electrónico (EI), que se usó para el análisis. Se usó una columna capilar DB-5MS (J&W Scientific, Agilent Technologies), 30 m x 0,25 mm de d.i. x 0,25 μ m de grosor de película. Se hizo funcionar el CG en un modo de inyección fraccionada introduciendo 1 μ l de muestra a una ración de fraccionamiento de 20:1. La temperatura del orificio de inyección era de 250°C. Se usó helio como gas portador, y se mantuvo la velocidad de flujo a 1,0 ml/min. Se optimizó un programa de gradiente de temperatura para garantizar buena resolución de los analitos de interés e interferencia de matriz mínima. Inicialmente se mantuvo el horno a 80°C durante 1 min, luego se aumentó hasta 120°C a 2°C/min, seguido por un aumento rápido hasta 320°C a 100°C/min y un mantenimiento final durante 6 min a 320°C. Se mantuvo el tubo de transferencia de conexión con EM a 280°C. Se adquirieron los datos usando ajustes de configuración de EM de "masa baja" y barrido en un intervalo de masa de 30-400 m/z. El tiempo de análisis total fue de 29 min incluyendo 3 min de retraso del disolvente. Los tiempos de retención correspondían a 5,2, 10,5, 14,0 y 18,2 min para ciclohexanol derivatizado con BSTFA, BDO, 4-HB y succinato, respectivamente. Para análisis cuantitativo, se seleccionaron los siguientes fragmentos de masa específica (cromatogramas de iones extraídos): m/z 157 para

ciclohexanol de patrón interno, 116 para BDO y 147 para tanto 4-HB como succinato. Se construyeron curvas de calibración patrones usando disoluciones de analito en el medio de cultivo celular o fermentación correspondiente para coincidir lo más posible con la matriz de muestra. Se procesaron los datos de CG-EM usando software Environmental Data Analysis ChemStation (Agilent Technologies).

Los resultados indicaron que la mayoría del 4-HB y BDO producidos estaban marcados con ^{13}C (figura 14, lados de la derecha). Para comparación se muestran espectros de masas a partir de un cultivo paralelo que se hizo crecer en glucosa no marcada (figura 14; lados de la izquierda). Obsérvese que los picos observados son para fragmentos de la molécula derivatizada que contenía diferentes números de átomos de carbono a partir del metabolito. El reactivo de derivatización también aporta algunos átomos de carbono y silicio que marcan la distribución que se produce de manera natural, por lo que los resultados no son estrictamente cuantitativos.

Producción de BDO a partir de 4-HB usando rutas alternativas. También se sometieron a prueba las diversas rutas alternativas para la producción de BDO. Éstas incluyen el uso de la enzima SucCD de *E. coli* nativa para convertir succinato en succinil-CoA (tabla 13, filas 2-3), el uso de α -cetoglutarato descarboxilasa en la ruta de α -cetoglutarato (tabla 13, fila 4) y el uso de PTB/BK como medio alternativo para generar el derivado de CoA de 4HB (tabla 13, fila 1). Se construyeron cepas que contenían plásmidos que expresaban los genes indicados en la tabla 13, que abarcan estas variantes. Los resultados muestran que en todos los casos, se produjo la producción de 4-HB y BDO (tabla 13).

Tabla 13. Producción de BDO, 4-HB, y succinato en genes de cepas de *E. coli* recombinantes para variantes de la ruta de BDO diferentes, que se hacen crecer de manera anaerobia en medio mínimo complementado con glucosa 20 g/l, y se recogen 24 horas tras la inducción con IPTG 0,1 mM. Las concentraciones se facilitan en mM.

Genes en pZE13	Genes en pZA33	Succinato	4-HB	BDO
0002+0004+0035	0020n-0021n-0036	0,336	2,91	0,230
0038+0035	0034-0036	0,814	2,81	0,126
0038+0035	0036-0034	0,741	2,57	0,114
0035+0032	0034-0036	5,01	0,538	0,154

EJEMPLO V

Biosíntesis de ácido 4-hidroxi-butanoico, γ -butirolactona y 1,4-butanodiol

Este ejemplo describe la producción biosintética de ácido 4-hidroxi-butanoico, γ -butirolactona y 1,4-butanodiol usando fermentación y otros bioprocedimientos.

A continuación se describen métodos para la integración de la etapa de fermentación de 4-HB en un procedimiento completo para la producción de GBL, 1,4-butanodiol (BDO) y tetrahidrofurano (THF) purificados. Puesto que 4-HB y GBL están en equilibrio, el caldo de fermentación contendrá ambos compuestos. A pH bajo este equilibrio se desplaza a favor de GBL. Por tanto, la fermentación puede funcionar a pH 7,5 o menor, generalmente pH 5,5 o menor. Tras la eliminación de la biomasa, la corriente de producto entra en una etapa de separación en la que se elimina GBL y se recircula la corriente restante enriquecida en 4-HB. Finalmente, se destila GBL para eliminar cualquier impureza. El procedimiento funciona de una de tres maneras: 1) fermentación de alimentación discontinua y separación discontinua; 2) fermentación de alimentación discontinua y separación continua; 3) fermentación continua y separación continua. Los dos primeros de estos modos se muestran esquemáticamente en la figura 15. Los procedimientos de fermentación integrados descritos a continuación también se usan para las células productoras de BDO de la invención para la biosíntesis de BDO y productos de la familia de BDO posteriores.

Protocolo de fermentación para producir 4-HB/GBL (discontinuo): Se hace crecer el organismo de producción en un biorreactor de 10 l burbujeado con una mezcla de N_2/CO_2 , usando 5 l de caldo que contiene fosfato de potasio 5 g/l, cloruro de amonio 2,5 g/l, sulfato de magnesio 0,5 g/l y licor de maceración de maíz 30 g/l, y una concentración de glucosa inicial de 20 g/l. A medida que las células crecen y usan la glucosa, se alimenta glucosa al 70% adicional en el biorreactor a una velocidad que equilibra aproximadamente el consumo de glucosa. Se mantiene la temperatura del biorreactor a 30°C. El crecimiento continúa durante aproximadamente 24 horas, hasta que 4-HB alcanza una concentración de entre 20-200 g/l, siendo la densidad celular de entre 5 y 10 g/l. El pH no se controla, y normalmente disminuirá hasta pH 3-6 al final de la ejecución. Tras completarse el periodo de cultivo, se pasa el contenido del fermentador a través de una unidad de separación de celular (por ejemplo, centrífuga) para eliminar las células y los residuos celulares, y se transfiere el caldo de fermentación a una unidad de separación de producto. El aislamiento de 4-HB y/o GBL tendrá lugar mediante procedimientos de separación convencionales empleados en la técnica para separar productos orgánicos de disoluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido usando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una disolución orgánica de 4-HB/GBL. Entonces se somete la disolución resultante a métodos de destilación convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar GBL (punto de ebullición de 204-205°C) que se aísla como un líquido purificado.

- 5 Protocolo de fermentación para producir 4-HB/GBL (completamente continuo): En primer lugar se hace crecer el organismo de producción en modo discontinuo usando el aparato y la composición de medio descritos anteriormente, excepto porque la concentración de glucosa inicial es de 30-50 g/l. Cuando se agota la glucosa, se suministra medio de alimentación de la misma composición de manera continua a una velocidad de entre 0,5 l/h y 1 l/h y se retira líquido a la misma velocidad. La concentración de 4-HB en el biorreactor permanece constante a 30-40 g/l, y la densidad celular permanece constante a entre 3-5 g/l. Se mantiene la temperatura a 30°C, y se mantiene el pH a 4,5 usando NaOH y HCl concentrados, según se requiera. Se hace funcionar el biorreactor de manera continua durante un mes, tomándose muestras cada día para garantizar la constancia de la concentración de 4-HB.
- 10 En modo continuo, se retira constantemente el contenido del fermentador a medida que se suministra medio de alimentación nuevo. Entonces se somete la corriente de salida, que contiene células, medio y productos 4-HB y/o GBL, a un procedimiento de separación de producto continuo, con o sin eliminación de células y residuos celulares, y tendrá lugar mediante métodos de separación continua convencionales empleados en la técnica para separar productos orgánicos de disoluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido continua usando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una disolución orgánica de 4-HB/GBL. Posteriormente se somete la disolución resultante a métodos de destilación continua convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar GBL (punto de ebullición de 204-205°C) que se aísla como un líquido purificado.
- 20 Protocolo de reducción de GBL: Una vez aislado y purificado GBL tal como se describió anteriormente, entonces se someterá a protocolos de reducción tales como aquéllos bien conocidos en la técnica (referencias citadas) para producir 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos. Se conocen bien catalizadores de hidrogenación heterogéneos u homogéneos combinados con GBL a presión de hidrógeno para proporcionar los productos 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos. Es importante observar que la mezcla del producto 4-HB/GBL que se separa del caldo de fermentación, tal como se describió anteriormente, puede someterse directamente, antes del aislamiento y la purificación de GBL, a estos mismos protocolos de reducción para proporcionar los productos 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano o una mezcla de los mismos. Entonces se aíslan y se purifican los productos resultantes, 1,4-butanodiol y THF, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.
- 30 Protocolo de fermentación e hidrogenación para producir BDO o THF directamente (discontinuo): Se hacen crecer células en un biorreactor de 10 l burbujeadado con una mezcla de N₂/CO₂, usando 5 l de caldo que contiene fosfato de potasio 5 g/l, cloruro de amonio 2,5 g/l, sulfato de magnesio 0,5 g/l y licor de maceración de maíz 30 g/l, y una concentración de glucosa inicial de 20 g/l. A medida que las células crecen y usan la glucosa, se alimenta glucosa al 70% adicional en el biorreactor a una velocidad que equilibra aproximadamente el consumo de glucosa. Se mantiene la temperatura del biorreactor a 30°C. El crecimiento continua durante aproximadamente 24 horas, hasta que 4-HB alcanza una concentración de entre 20-200 g/l, siendo la densidad celular de entre 5 y 10 g/l. No se controla el pH, y normalmente disminuirá hasta pH 3-6 hacia el final de la ejecución. Tras completarse el periodo de cultivo, se pasa el contenido del fermentador a través de una unidad de separación celular (por ejemplo, centrífuga) para eliminar células y residuos celulares, y se transfiere el caldo de fermentación a una unidad de reducción (por ejemplo, recipiente de hidrogenación), en la que se reduce directamente la mezcla de 4-HB/GBL para dar o bien 1,4-butanodiol o bien THF o bien una mezcla de los mismos. Tras completarse el procedimiento de reducción, se transfiere el contenido del reactor a una unidad de separación de producto. El aislamiento de 1,4-butanodiol y/o THF tendrá lugar mediante procedimientos de separación convencionales empleados en la técnica para separar productos orgánicos de disoluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido usando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una disolución orgánica de 1,4-butanodiol y/o THF. Entonces se somete la disolución resultante a métodos de destilación convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar 1,4-butanodiol y/o THF que se aíslan como líquidos purificados.
- 50 Protocolo de fermentación e hidrogenación para producir BDO o THF directamente (completamente continuo): En primer lugar se hacen crecer las células en modo discontinuo usando el aparato y la composición de medio descritos anteriormente, excepto porque la concentración de glucosa inicial es de 30-50 g/l. Cuando se agota la glucosa, se suministra medio de alimentación de la misma composición de manera continua a una velocidad de entre 0,5 l/h y 1 l/h, y se retira líquido a la misma velocidad. La concentración de 4-HB en el biorreactor permanece constante a 30-40 g/l, y la densidad celular permanece constante a entre 3-5 g/l. Se mantiene la temperatura a 30°C, y se mantiene el pH a 4,5 usando NaOH y HCl concentrados, según se requiera. Se hace funcionar el biorreactor de manera continua durante un mes, tomándose muestras cada día para garantizar la constancia de la concentración de 4-HB.
- 55 En modo continuo, se retira constantemente el contenido del fermentador a medida que se suministra medio de alimentación nuevo. Entonces se hace pasar la corriente de salida, que contiene células, medio y productos 4-HB y/o GBL, a través de una unidad separación celular (por ejemplo, centrífuga) para eliminar células y residuos celulares, y se transfiere el caldo de fermentación a una unidad de reducción continua (por ejemplo, recipiente de hidrogenación), en el que se reduce directamente la mezcla 4-HB/GBL para dar o bien 1,4-butanodiol o bien THF o bien una mezcla de los mismos. Tras completarse el procedimiento de reducción, se transfiere el contenido del reactor a una unidad de separación de producto continua. El aislamiento de 1,4-butanodiol y/o THF tendrá lugar mediante procedimientos de separación continua convencionales empleados en la técnica para separar productos orgánicos de disoluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido usando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una disolución orgánica de 1,4-butanodiol y/o THF.

Entonces se somete la disolución resultante a métodos de destilación continua convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y proporcionar 1,4-butanodiol y/o THF que se aíslan como líquidos purificados.

5 Protocolo de fermentación para producir BDO directamente (discontinuo): Se hace crear el organismo de producción en un biorreactor de 10 l burbujeador con una mezcla de N₂/CO₂, usando 5 l de caldo que contiene fosfato de potasio 5 g/l, cloruro de amonio 2,5 g/l, sulfato de magnesio 0,5 g/l y licor de maceración de maíz 30 g/l, y una concentración de glucosa inicial de 20 g/l. A medida que las células crecen y usan la glucosa, se alimenta glucosa al 70% adicional en el biorreactor a una velocidad que equilibra aproximadamente el consumo de glucosa. Se mantiene la temperatura del biorreactor a 30°C. El crecimiento continúa durante aproximadamente 24 horas, hasta que el BDO
10 alcanza una concentración de entre 20-200 g/l, siendo la densidad celular generalmente de entre 5 y 10 g/l. Tras completarse el periodo de cultivo, se pasa el contenido del fermentador a través de una unidad de separación celular (por ejemplo, centrífuga) para eliminar células y residuos celulares, y se transfiere el caldo de fermentación a una unidad de separación de producto. El aislamiento de BDO tendrá lugar mediante procedimientos de separación convencionales empleados en la técnica para separar productos orgánicos de disoluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido usando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una disolución orgánica de BDO. Entonces se somete la disolución resultante a métodos de destilación convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y proporcionar BDO (punto de ebullición de 228-229°C) que se aísla como un líquido purificado.

20 Protocolo de fermentación para producir BDO directamente (completamente continuo): En primer lugar se hace crecer el organismo de producción en modo discontinuo usando el aparato y la composición de medio descritos anteriormente, excepto porque la concentración de glucosa inicial es de 30-50 g/l. Cuando se agota la glucosa, se suministra medio de alimentación de la misma composición de manera continua a una velocidad de entre 0,5 l/h y 1 l/h, y se retira líquido a la misma velocidad. La concentración de BDO en el biorreactor permanece constante a 30-40 g/l, y la densidad celular permanece constante a entre 3-5 g/l. Se mantiene la temperatura a 30°C, y se mantiene el pH a 4,5 usando NaOH y HCl concentrados, según se requiera. Se hace funcionar el biorreactor de manera continua durante un mes, tomándose muestras cada día para garantizar la constancia de la concentración de BDO. En modo continuo, se retira constantemente el contenido del fermentador a medida que se suministra medio de alimentación nuevo. Entonces se somete la corriente de salida, que contiene células, medio y el producto BDO, a un procedimiento de separación de producto continuo, con o sin eliminación de células y residuos celulares, y tendrá lugar mediante métodos de separación continua convencionales empleados en la técnica para separar productos orgánicos de disoluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido continua usando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una disolución orgánica de BDO. Posteriormente se somete la disolución resultante a métodos de destilación continua convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y proporcionar BDO (punto de ebullición de 228-229°C) que se aísla como un líquido purificado (p.f. 20°C).

40 Aunque se ha descrito la invención con referencia a las realizaciones dadas a conocer, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los ejemplos y estudios específicos detallados anteriormente sólo son ilustrativos de la invención. Debe entenderse que pueden hacerse diversas modificaciones. Por consiguiente, la invención sólo se limita por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (1,4-BDO), comprendiendo dichas rutas ácidos nucleicos exógenos que codifican para a) una α -cetoglutarato descarboxilasa, b) una 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, c) una butirato cinasa y una fosfotransbutirilasa, o una 4-hidroxi-butiril-CoA:acetil-CoA transferasa, d) una aldehído deshidrogenasa y e) una alcohol deshidrogenasa, en el que dichos ácidos nucleicos exógenos se expresan en cantidades suficientes para producir 1,4-butanodiol (1,4-BDO).
- 10 2. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que dichos ácidos nucleicos exógenos comprenden al menos un ácido nucleico heterólogo.
- 15 3. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, que comprende además un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.
4. Método para la producción de 1,4-BDO que comprende cultivar el organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1 en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,4-BDO.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que al menos un ácido nucleico exógeno comprende un ácido nucleico heterólogo.

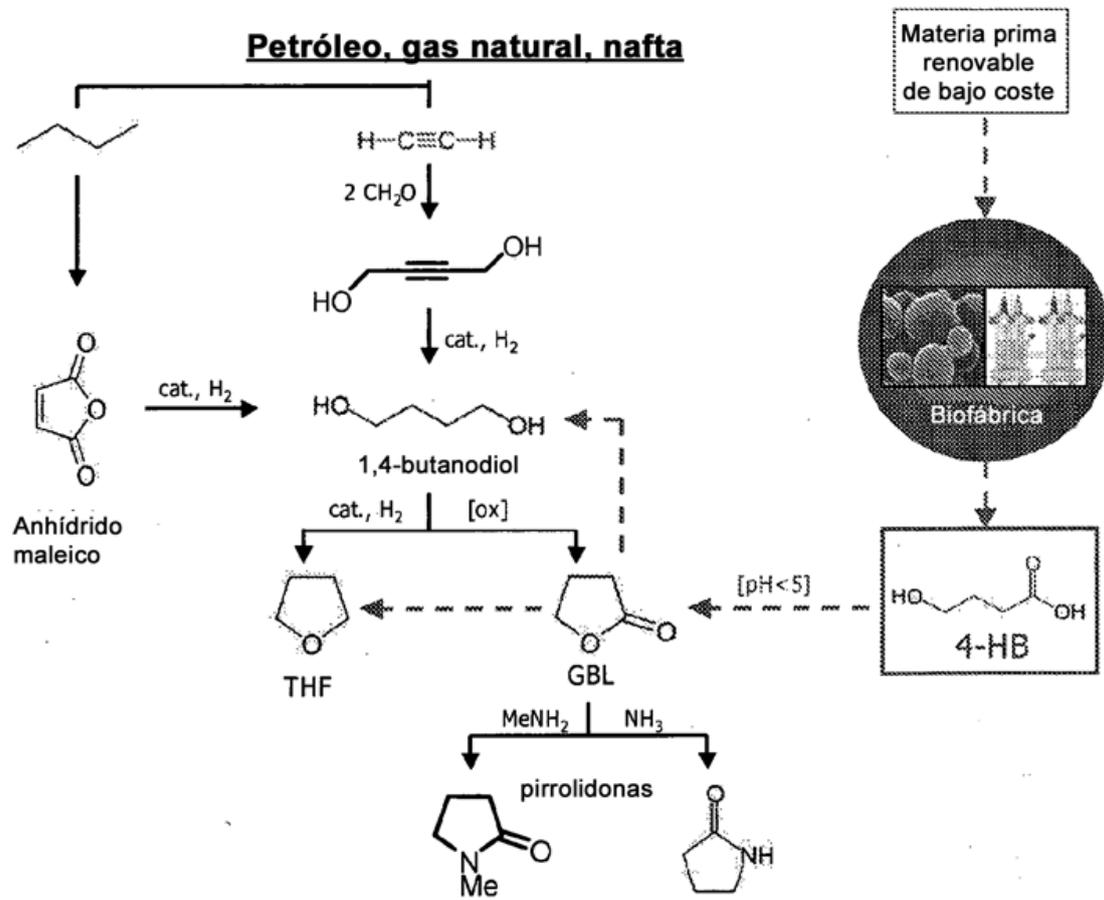


FIGURA 1

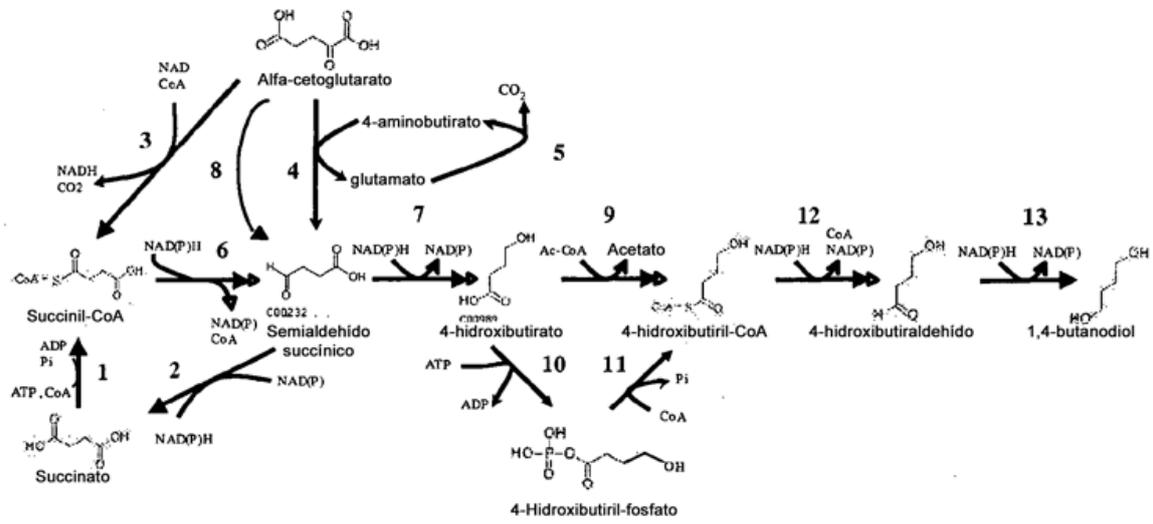


FIGURA 2

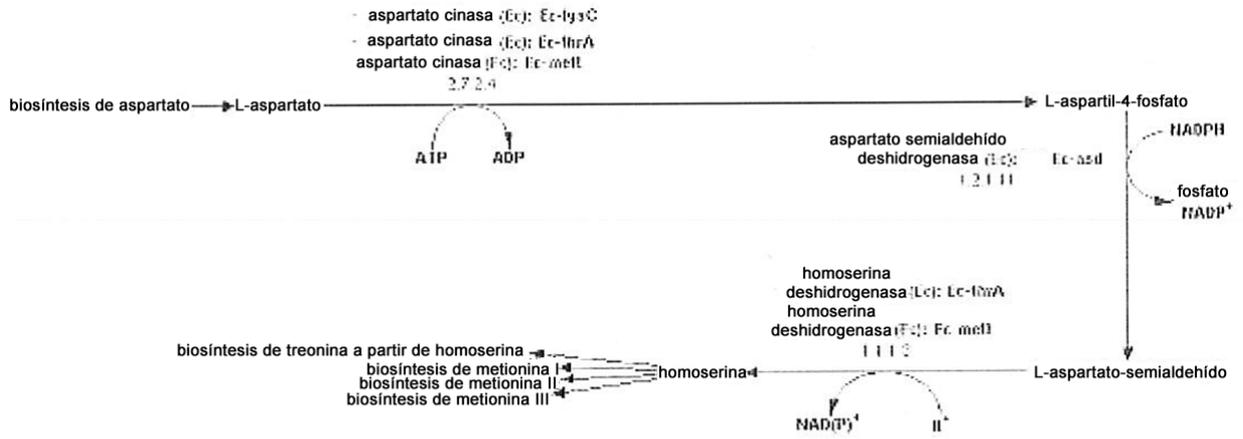


FIGURA 3

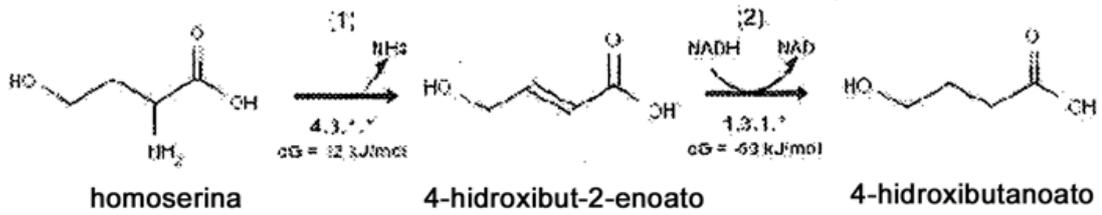


FIGURA 4

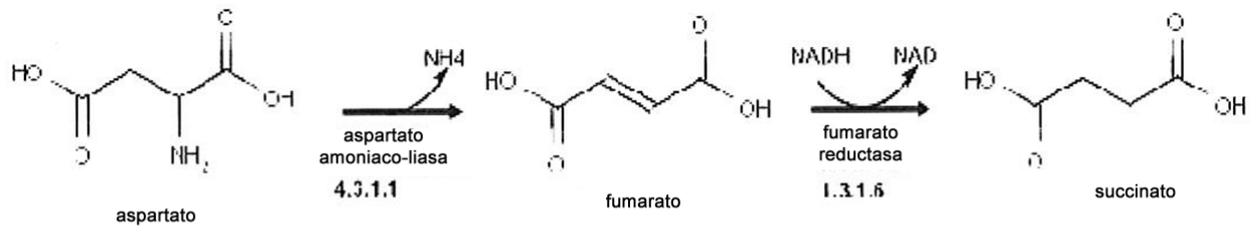


FIGURA 5

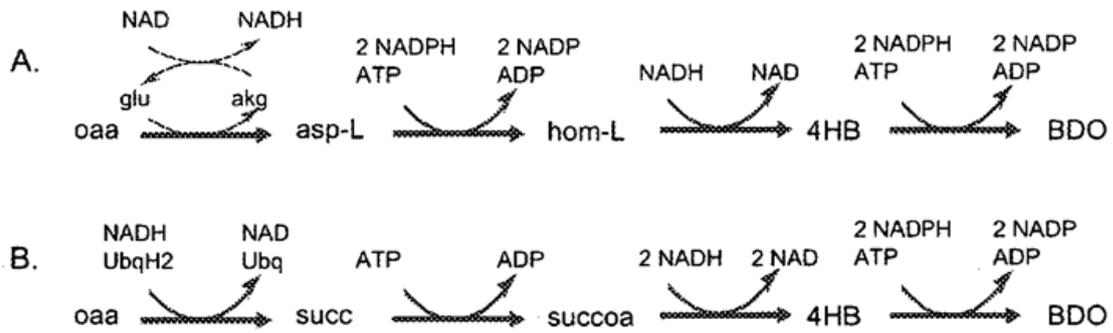


FIGURA 6

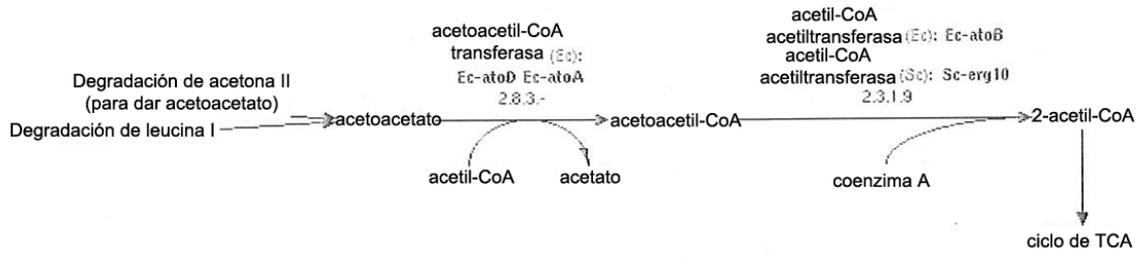


FIGURA 7

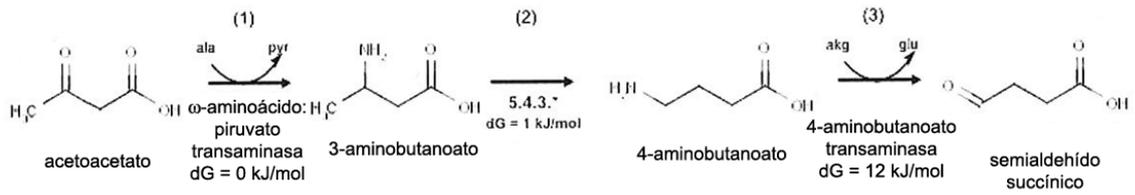


FIGURA 8

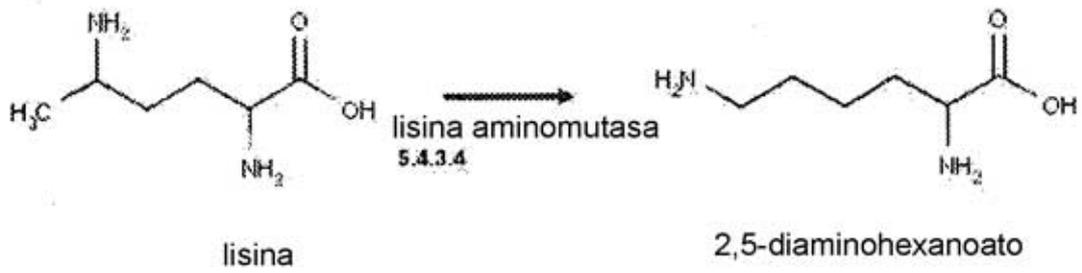


FIGURA 9

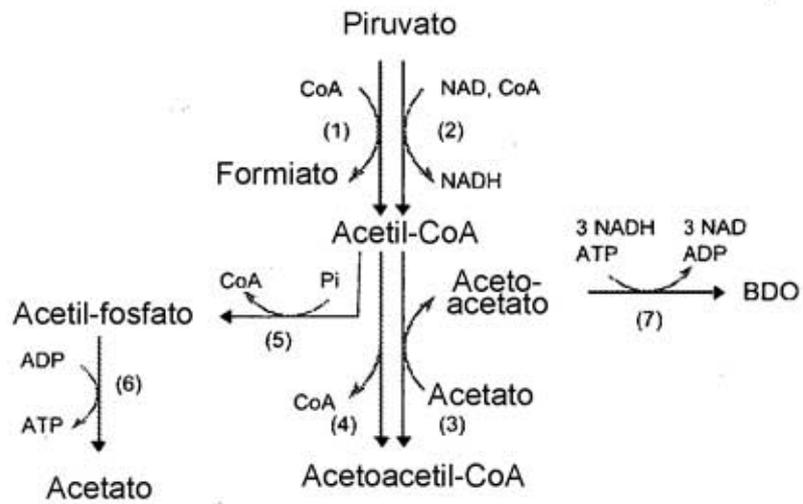


FIGURA 10

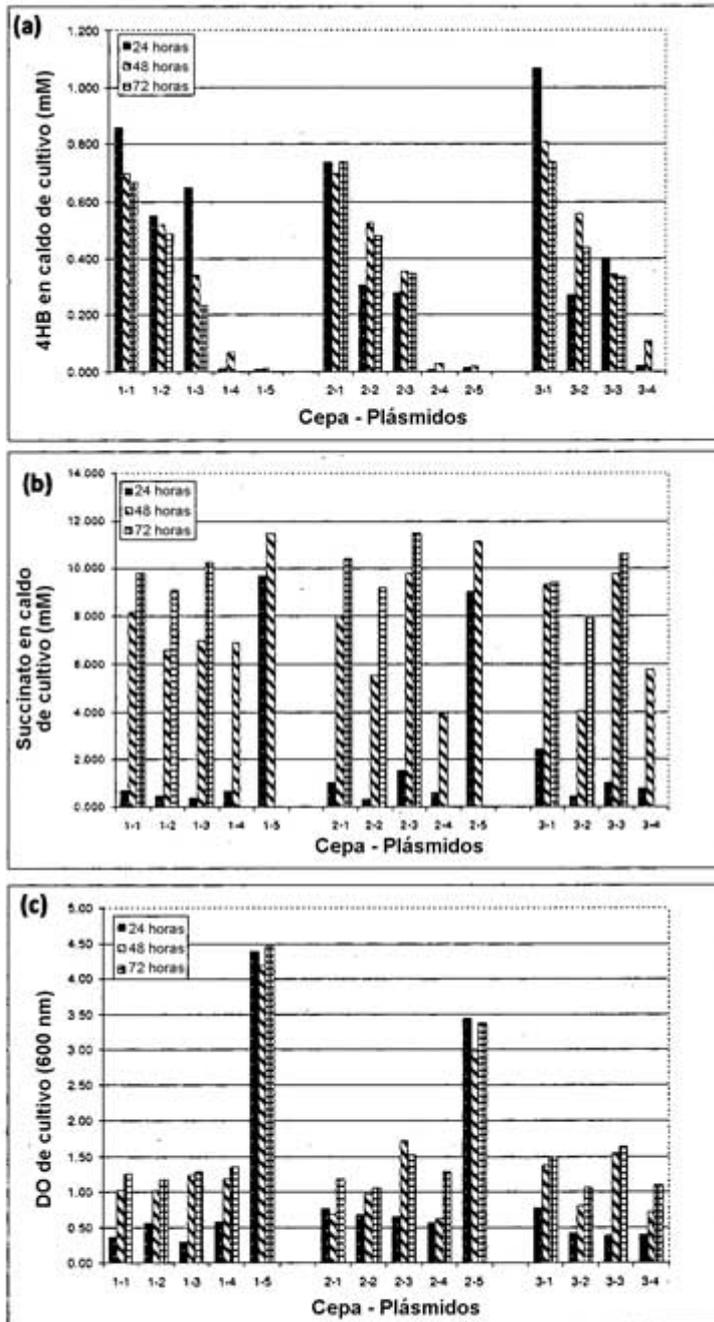


FIGURA 11

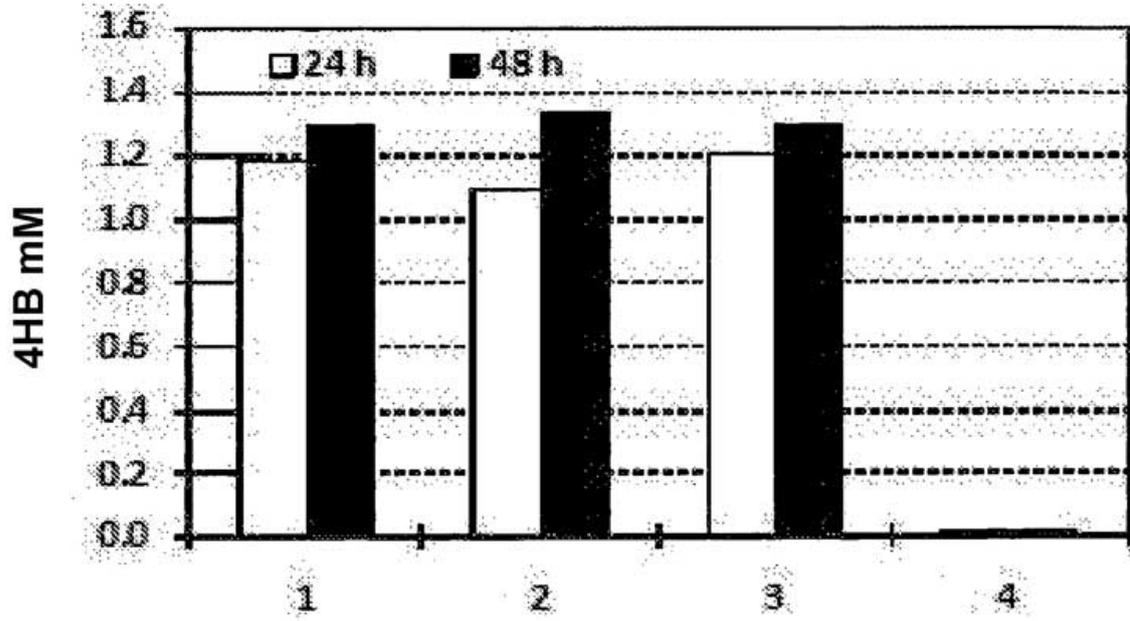


FIGURA 12

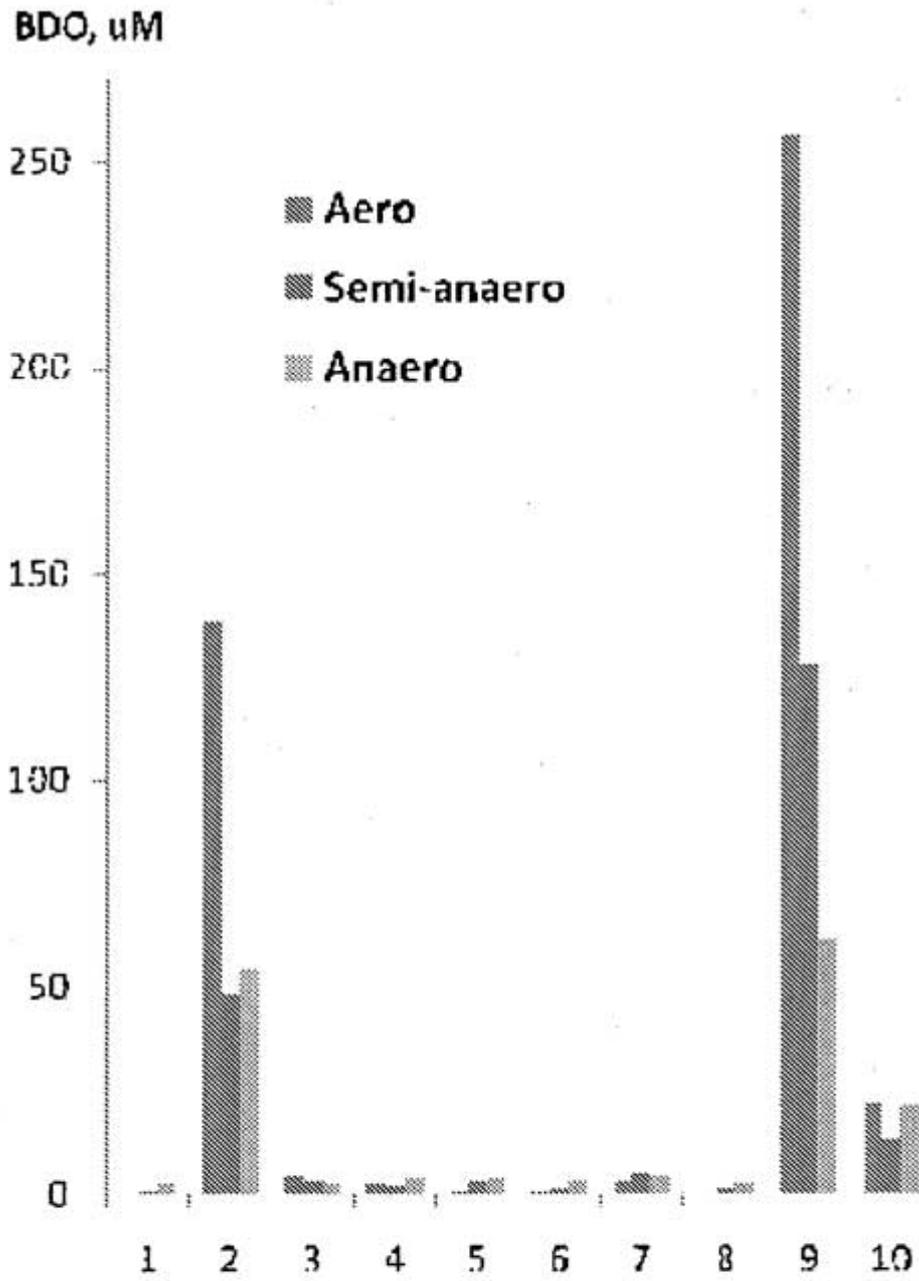


FIGURA 13

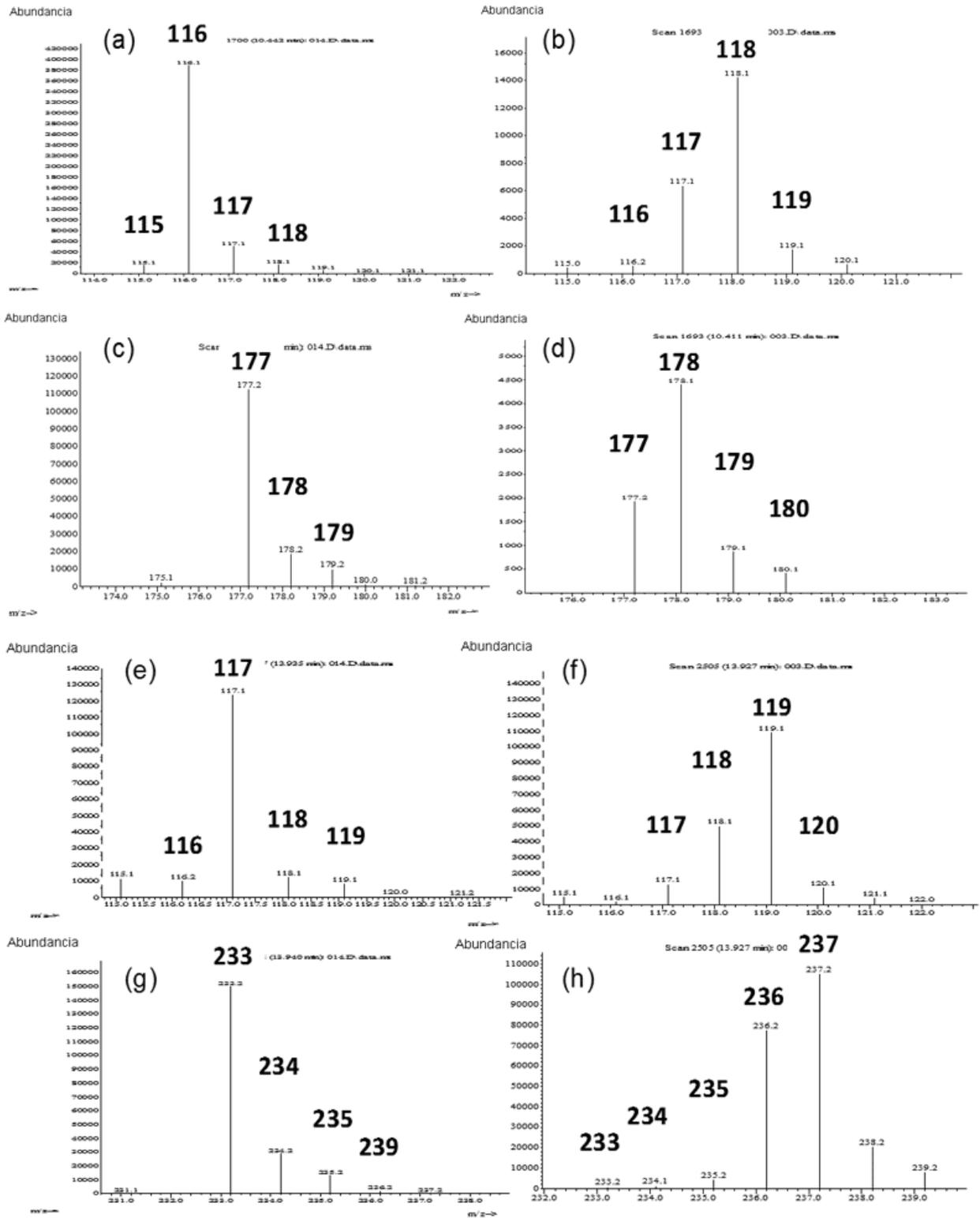


FIGURA 14

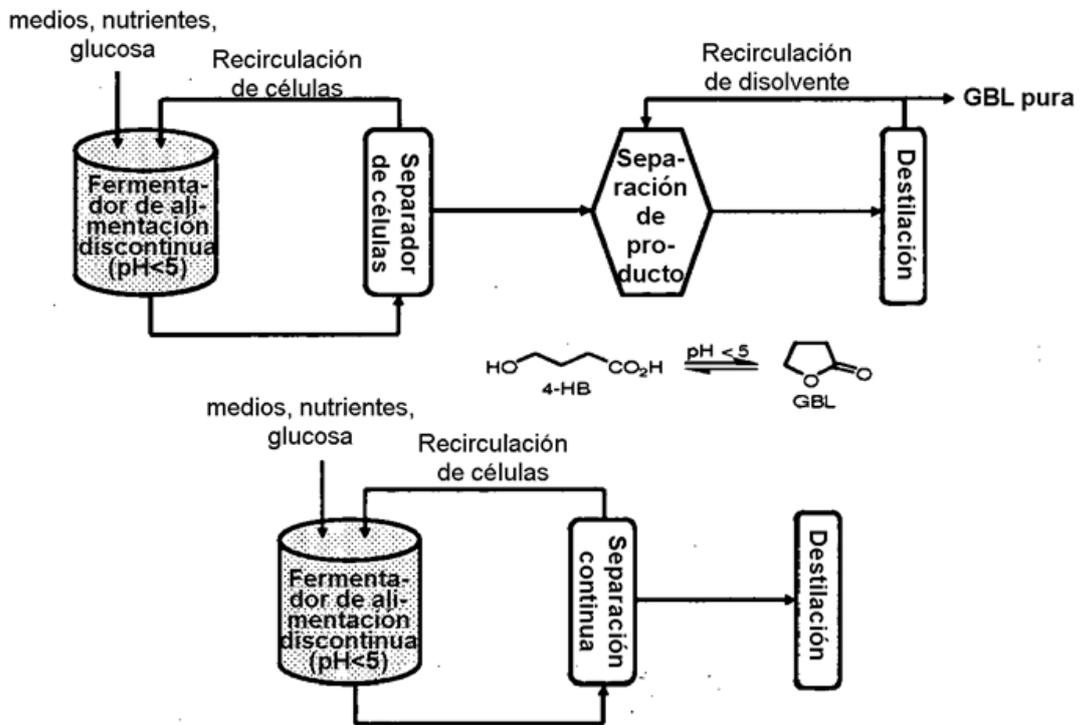


FIGURA 15