

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 179**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008** **E 08782639 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016** **EP 2185708**

54 Título: **Métodos y organismos para la producción de 1,4-butanodiol acoplada al crecimiento**

30 Prioridad:

10.08.2007 US 891602

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

19.09.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BURGARD, ANTHONY, P.;
VAN DIEN, STEPHEN, J. y
BURK, MARK, J.

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 583 179 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y organismos para la producción de 1,4-butanodiol acoplada al crecimiento

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere generalmente al diseño informático (*in silico*) de organismos, y más específicamente a organismos que tienen capacidad de biosintetizar el 1,4-butanodiol, como se define en las reivindicaciones.

10 1,4-Butanodiol (BDO) es un dialcohol de cuatro átomos de carbono que actualmente se fabrica exclusivamente a través de varias rutas petroquímicas. El BDO forma parte de una familia de disolventes e intermedios poliméricos de gran volumen que incluye gamma-butirolactona (GBL), tetrahydrofurano (THF), pirrolidona, N-metilpirrolidona (NMP), y N-vinil-pirrolidona. La oportunidad global de mercado para esta familia excede los 4.000 millones de \$.

15 Se producen globalmente al año aproximadamente 2.500 millones de libras de BDO con un crecimiento anual del 4-5% con un precio reciente de venta que varía de 1,00 a 1,20 \$/lb. La demanda de BDO se debe en gran parte a su uso como compuesto intermedio de las resinas plásticas de tereftalato de polibuteno (PBT), poliuretanos termoplásticos y éteres de copoliéster. BDO sirve también como precursor principal de THF, que se emplea como compuesto intermedio para los copolímeros de poli(tetrametilenglicol) PTMEG necesarios para la producción de lycra y spandex. Se producen globalmente aproximadamente 700 millones de lb de THF por año con una tasa anual de crecimiento de aproximadamente el 6%. Un porcentaje significativo del crecimiento (>30%) de BDO y THF se produce en Asia (China e India). GBL es actualmente un producto de un volumen más pequeño (400 millones de lb/año) que tiene numerosas aplicaciones como disolvente, como un aditivo para tintas, pinturas, y colorantes, así como el precursor primario de derivados de pirrolidona tales como NMP.

25 Los procesos convencionales para la síntesis de BDO usan materias primas petroquímicas como sus materiales de partida. 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 Estados Unidos se consume en la producción de butanodiol. Como alternativa, se puede formar por esterificación e hidrogenación catalítica de anhídrido maleico, que se deriva de butano. Posteriormente, el butanodiol se puede transformar adicionalmente; por ejemplo, mediante oxidación de la γ -butirolactona, que se puede convertir adicionalmente en pirrolidona y N-metil-pirrolidona, o hidrogenólisis del tetrahydrofurano (figura 1). Estos compuestos tienen usos variados como compuestos intermedios, disolventes, y aditivos poliméricos, y tienen un mercado combinado de casi 2000 millones de lb/año.

35 Las soluciones convencionales basadas en materias primas de hidrocarburos utilizan metano para producir formaldehído. Por tanto, un gran porcentaje de la producción comercial de BDO se basa en metano como material de partida. La producción de acetileno se basa también en materiales de partida basados en petróleo (véase la figura 1). Por tanto, los costes de producción de BDO fluctúan con el precio del petróleo y el gas natural.

40 Es deseable desarrollar un método para la producción de estos productos químicos por medios alternativos que sustituyan no solo materias primas basadas en petróleo por renovables, y usen también menos energía y procesos de menor coste de inmovilizado. El Departamento de energía de Estados Unidos ha propuesto los 1,4-diácidos, y particularmente el ácido succínico, como compuestos intermedios clave producidos biológicamente para la fabricación de la familia de productos del butanodiol (DOE Report, "Top Value-Added Chemicals from Biomass", 2004). Sin embargo, el ácido succínico es muy costoso de aislar y purificar y requiere elevadas temperaturas y presiones para la reducción catalítica a butanodiol.

50 El documento JP 62285779 se refiere a la producción de 1,4-butanodiol inoculando una cepa bacteriana que pertenece al género *Bacillus* [cepa C-105 (FERM P-8788)] y es capaz de producir 1,4-butanodiol en un medio que contiene sacáridos y cultivar la cepa.

55 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 proporciona también ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

60 La invención proporciona un microorganismo que no se produce naturalmente que comprende un conjunto de modificaciones metabólicas que comprenden la perturbación de los genes *adhE*, *ldhA*, *pflAB* y *mdh*, en el que el microorganismo comprende además una ruta biosintética de 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica la 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxiutirato: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 cantidad suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO).

70

La invención se refiere adicionalmente a un método de producir 1,4-butanodiol, que comprende:

- (a) cultivar un microorganismo que no se produce naturalmente de la invención, en fase de crecimiento exponencial, en una cantidad suficiente de nutrientes y medios; y
- (b) aislar el 1,4-butanodiol producido a partir de dicho microorganismo que no se produce naturalmente.

Se definen aspectos adicionales de la invención en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un punto de entrada del ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) en la línea de producto de la familia de productos químicos del 1,4-butanodiol (BDO), y la comparación con las rutas de síntesis química de las materias primas petroquímicas. Las flechas negras sólidas muestran las rutas de síntesis química; las flechas azules punteadas muestran una ruta biosintética de 4-HB y las posteriores etapas de conversión de la familia de productos químicos de BDO.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra las rutas bioquímicas de producción de 4-hidroxi-butarato (4-HB) y γ -butirolactona (GBL). Los enzimas que catalizan las reacciones biosintéticas de 4-HB son: (1) semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA; (2) succinil-CoA sintetasa; (3) semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA; (4) glutamato: semialdehído succínico transaminasa; (5) glutamato decarboxilasa; (6) 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa. La conversión (7) corresponde a una reacción no enzimática espontánea, que convierte 4-HB en GBL.

La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra la síntesis química de 1,4-butanodiol (BDO) y los productos posteriores γ -butirolactona (GBL), tetrahidrofurano (THF) y algunas pirrolidonas.

La Figura 4 es un diagrama de flujo de proceso esquemático de los bioprocesos de producción de γ -butirolactona. El panel (a) ilustra la fermentación con alimentación discontinua con separación discontinua y el panel (b) ilustra la fermentación con alimentación discontinua con separación continua.

La Figura 5 muestra la envolvente de producción teórica de una cepa diseñada mediante OptKnock comparada con una cepa típica de producción no acoplada al crecimiento. Señalar que las trayectorias evolutivas potenciales de la cepa OptKnock son fundamentalmente diferentes en que conduce a un fenotipo de alta producción.

La Figura 6 muestra las rutas bioquímicas que conducen hasta el 1,4-butanodiol. 1) semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA; 2) succinil-CoA sintetasa; 3) semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA; 4) glutamato: semialdehído succínico transaminasa; 5) glutamato decarboxilasa; 6) 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa; 7) 4-hidroxi-butil CoA:acetil-CoA transferasa; 8) aldehído deshidrogenasa; 9) alcohol deshidrogenasa.

La Figura 7 muestra los límites de solución de la tasa de crecimiento anaerobio frente al rendimiento de BDO para una cepa de *E. coli* que tiene las rutas de producción de BDO mostradas y las desactivaciones génicas previstas por OptKnock en la Figura 5 suponiendo a) la irreversibilidad de la PEP carboxiquinasa y b) la reversibilidad de la PEP carboxiquinasa. Se supuso una tasa de captación de glucosa basa de 20 mmol/gDW/h junto con un requerimiento de mantenimiento de ATP no asociado al crecimiento de 7,6 mmol/gDW/h.

La Figura 8 muestra una representación gráfica del metabolismo central de *E. coli*.

La Figura 9 muestra los límites de solución de la tasa de crecimiento anaerobio frente al rendimiento de BDO para una cepa de *E. coli* que tiene las rutas de producción de BDO mostradas y las desactivaciones génicas previstas por OptKnock en la Figura 5 suponiendo la reversibilidad de la PEP carboxiquinasa. Se supuso una tasa de captación de glucosa basa de 20 mmol/gDW/h junto con un requerimiento de mantenimiento de ATP no asociado al crecimiento de 7,6 mmol/gDW/h.

Descripción detallada de la invención

Se divulga el diseño y la producción de células y organismos que tienen capacidades de producción biosintéticas para el ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB), γ -butirolactona y 1,4-butanodiol. En un aspecto, la descripción utiliza 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 se pueden diseñar y conseguir mediante ingeniería genética recombinante rutas metabólicas para conseguir la biosíntesis de 4-HB y de los 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 se puede confirmar mediante la construcción de cepas que tienen el genotipo metabólico diseñado. Estas células u organismos diseñados metabólicamente mediante ingeniería genética se pueden someter a evolución adaptativa para aumentar adicionalmente la biosíntesis de 4-HB, incluyendo en condiciones que se aproximan al crecimiento máximo teórico.

Se divulgan además estrategias de diseño mediante ingeniería metabólica para obtener rendimientos elevados de 1,4-butanodiol (BDO) en *Escherichia coli* (véanse los Ejemplos V-VII). Como se divulga en el presente documento,

se empleó un modelo estequiométrico a escala genómica del metabolismo de *E. coli* utilizando la infraestructura informática de optimización de dos niveles OptKnock para identificar estrategias informáticas con múltiples inactivaciones génicas. Las delecciones se introducen de tal manera que se reduce la redundancia en la red con el efecto en última instancia de acoplar el crecimiento a la producción de BDO en la red. Las características de producción de BDO acopladas al crecimiento de las cepas diseñadas las convierten en genéticamente estables y adecuadas para bioprocesos continuos. Se identificaron estrategias de diseño de cepas suponiendo la adición de capacidades de reacción no naturales en *E. coli* que conducen a una ruta metabólica desde el succinato semialdehído a BDO. De los cientos de estrategias identificadas por OptKnock, surgió un diseño que satisface múltiples criterios. Este diseño, que utiliza la eliminación de *adhE*, *ldhA*, *mdh*, *aspA*, y *pflAB*, 1) conduce a un elevado rendimiento de BDO previsto a crecimiento máximo, 2) requirió un número de desactivaciones razonable, 3) no tuvo un efecto perjudicial sobre el rendimiento teórico máximo de BDO, 4) consiguió un acoplamiento fuerte entre la producción de BDO y el crecimiento celular, y 5) era sólido con respecto a la supuesta irreversibilidad o reversibilidad de la PEP carboxiquinasa. Se divulgan también en el presente documento métodos para el ensayo experimental de diseños de cepas y su evolución hacia el crecimiento máximo teórico.

En determinados aspectos, las características de la biosíntesis de 4-HB de las cepas diseñadas las convierten en genéticamente estables y adecuadas para bioprocesos continuos. Se identificaron estrategias de diseño de cepas independientes con la incorporación de capacidades de reacción no naturales o heterólogas diferente en *E. coli* que conducen a rutas metabólicas productoras de 4-HB y 1,4-butanodiol derivados de la semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa y semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, o glutamato:semialdehído succínico transaminasa. Se identificaron diseños metabólicos in silico que dieron como resultado la biosíntesis de 4-HB en especies de *E. coli* y levadura procedentes de cada una de estas rutas metabólicas. El compuesto intermedio de 1,4-butanodiol, γ -butirolactona, se puede generar en cultivo mediante ciclación espontánea en condiciones de pH<7,5, particularmente en condiciones ácidas, tales como por debajo de pH 5,5, por ejemplo, pH<7, pH<6,5, pH<6, y particularmente a pH<5,5 o inferior.

Las cepas identificadas mediante el componente de cálculo de la plataforma pueden llevarse a la producción real genomaniplando cualquiera de las alteraciones metabólicas previstas que conducen a la producción biosintética de 4-HB, 1,4-butanodiol u otros compuestos intermedios y/o productos posteriores. En otro aspecto más, las cepas que presentan producción biosintética de estos compuestos pueden someterse adicionalmente a evolución adaptativa para aumentar además la biosíntesis del producto. Los niveles de rendimiento de la biosíntesis del producto después de la evolución adaptativa también se pueden predecir mediante el componente de cálculo del sistema.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "que no se produce naturalmente", cuando se usa en referencia a un organismo microbiano o microorganismo 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 naturalmente de las especies citadas, incluyendo las cepas silvestres de las especies citadas. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácidos nucleicos, delecciones de ácidos nucleicos y/u otras perturbaciones funcionales del material genético microbiano. Dicha modificación incluye, por ejemplo, regiones codificantes y fragmentos funcionales de las mismas, de polipéptidos heterólogos, homólogos o heterólogos y homólogos de las especies citadas. 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 ilustrativos incluyen enzimas comprendidas en la ruta biosintética de 4-HB y enzimas comprendidas en la ruta biosintética de la familia de compuestos de BDO.

Una modificación metabólica se refiere a una reacción bioquímica que está alterada a partir de su estado que se produce naturalmente. Por tanto, los microorganismos que no se producen naturalmente tienen modificaciones genéticas en ácidos nucleicos que codifican polipéptidos metabólicos o, fragmentos funcionales de los mismos. Se describen modificaciones metabólicas ilustrativas adicionalmente a continuación para *E. coli* y organismos microbianos de levaduras.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "aislado", cuando se usa en referencia a un organismo microbiano, signifique un organismo que está sustancialmente exento de al menos un componente que posee el organismo microbiano natural citado. El término incluye un organismo microbiano al que se eliminan alguno o todos los componentes que se encuentran en su entorno natural. El término incluye también un organismo microbiano al que se eliminan alguno o todos los componentes que el organismo microbiano tiene en entornos que no se producen naturalmente. Por tanto, un organismo microbiano aislado está parcial o completamente separado de otras sustancias que se encuentran en la naturaleza o a medida que crece, se almacena o subsiste en entornos que no se producen naturalmente. Los ejemplos específicos de organismos microbianos aislados incluyen microbios parcialmente puros, microbios sustancialmente puros y microbios cultivados en un medio que no se produce naturalmente.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que los términos "microbiano", "organismo microbiano" o "microorganismo" signifiquen cualquier organismo que exista como una célula microscópica que esté incluido en los dominios de archaea, bacteria o eukarya. Por tanto, se pretende que el término abarque células u organismos procariotas o eucariotas que tengan un tamaño microscópico e incluye bacterias, archaeas y eubacterias de todas las especies, así como microorganismos eucariotas tales como levaduras y hongos. El término incluye también cultivos celulares de cualquier especie que se pueda cultivar para la producción de un producto bioquímico.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "ácido 4-hidroxibutanoico" signifique un derivado 4-hidroxi 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-hidroxibutanoico se conoce también en la técnica como 4-HB, 4-hidroxibutirato, ácido gamma-hidroxibutírico o GHB. Se pretende que el término tal como se usa en el presente documento incluya cualquiera de las diversas formas salinas de los compuestos e incluye, por ejemplo, 4-hidroxibutanoato y 4-hidroxibutirato. Los ejemplos específicos de formas salinas de 4-HB incluyen sodio 4-HB y potasio 4-HB. Por tanto, los términos ácido 4-hidroxibutanoico, 4-HB, 4-hidroxibutirato, 4-hidroxibutanoato, ácido gamma-hidroxibutírico y GBH así como otros nombres reconocidos en la técnica se usan como sinónimos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "monomérico" cuando se usa en referencia a 4-HB signifique 4-HB en forma no polimérica o sin derivatizar. Los ejemplos específicos de 4-HB polimérico incluyen ácido poli-4-hidroxibutanoico y los copolímeros de, por ejemplo, 4-HB y 3-HB. Un ejemplo específico de una forma derivatizada de 4-HB es 4-HB-CoA. Se conocen también en la materia 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 se conoce también en la técnica como GBL, butirolactona, 1,4-lactona, 4-butirolactona, ácido 4-hidroxibutírico lactona, y ácido gamma-hidroxibutírico lactona. Se pretende que el término, tal como se usa en el presente documento, incluya cualquiera de las diversas formas salinas de los compuestos.

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 transporta dos grupos hidroxilo que tienen la fórmula química $C_4H_{10}O_2$ y una masa molecular de 90,12 g/mol. El compuesto químico 1,4 butanodiol se conoce también en la técnica como BDO y es un compuesto intermedio o precursor químico de una familia de compuestos denominada en el presente documento como familia BDO de compuestos, algunos de los cuales se ilustran en la figura 1.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "tetrahidrofurano" signifique un compuesto orgánico heterocíclico que corresponde 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 se conoce también en la técnica como THF, tetrahidrofurano, 1,4-epoxibutano, óxido de butileno, óxido de ciclotetrametileno, oxaciclopentano, óxido de dietileno, oxolano, furanidina, hidrofurano, tetraóxido de metileno. Se pretende que el término, tal como se usa en el presente documento, incluya cualquiera de las diversas formas salinas de los compuestos.

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 un 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 condensadoras, actúa en la transferencia del acetilo u otros grupos acilo y en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, la oxidación del piruvato y en otras acetilaciones.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "sustancialmente anaerobio", cuando se usa en referencia a un cultivo o condición de crecimiento, signifique que la cantidad de oxígeno es menos de aproximadamente 10% de saturación para el oxígeno disuelto en un medio líquido. Se pretende también que el término incluya cámaras precintadas de medio líquido o sólido mantenidas con una atmósfera de menos de aproximadamente un 1% de oxígeno.

Los organismos microbianos no naturales de la invención pueden contener alteraciones genéticas estables, que se refieren a microorganismos que se pueden cultivar durante más de cinco generaciones sin perder la alteración. En general, las alteraciones genéticas estables incluyen modificaciones que persisten más de 10 generaciones, las modificaciones particularmente estables persistirán más de aproximadamente 25 generaciones, y más especialmente, las modificaciones genéticas estables serán superiores a 50 generaciones, incluyendo de forma indefinida.

Los expertos en la materia entenderán que las alteraciones genéticas, incluyendo las modificaciones metabólicas ilustradas en el presente documento, se describen con referencia a genes de *E. coli* y levadura y sus correspondientes reacciones metabólicas. Sin embargo, dada la secuenciación completa del genoma de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de capacidad en el campo de la genómica, los expertos en la materia serán fácilmente capaces de aplicar las enseñanzas y las directrices proporcionadas en el presente documento esencialmente a todos los diferentes organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de *E. coli* ilustradas en el presente documento pueden aplicarse fácilmente a otras especies incorporando los mismos ácidos nucleicos codificantes o sus análogos de especies diferentes de las especies citadas. Dichas alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de especies homólogas, por lo general, y en particular, ortólogas, desplazamientos de genes parálogos o no ortólogos.

Un ortólogo es un gen o genes que están relacionados por una descendencia vertical y son responsables de funciones sustancialmente iguales o idénticas en diferentes organismos. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa de ratón y la epóxido hidrolasa de ser humano se pueden considerar ortólogos para la función biológica de hidrólisis de los epóxidos. Los genes están relacionados por una descendencia vertical cuando, por ejemplo, comparten una similitud

de secuencias en cantidad suficiente para indicar que son homólogos, o están relacionados evolutivamente a partir de un ancestro común. Los genes se pueden considerar también ortólogos si comparten la estructura tridimensional pero no necesariamente la similitud de la secuencia, de una cantidad suficiente para indicar que han evolucionado a partir de un ancestro común en la medida en la que la similitud de la secuencia primaria no sea identificable. Los genes que son ortólogos pueden codificar proteínas con una similitud de secuencias de aproximadamente 25% a 100% de identidad en la secuencia de aminoácidos. Puede considerarse que los genes que codifican proteínas que comparten una similitud de aminoácidos menor del 25% proceden de descendencia vertical si su estructura tridimensional muestra también similitudes. Los miembros de la familia de enzimas de las serina proteasas, incluyendo el activador del plasminógeno tisular y la elastasa, se consideran procedentes de una descendencia vertical a partir de un ancestro común.

Los ortólogos incluyen genes o sus productos génicos codificados que mediante, por ejemplo, evolución, han divergido en estructura o actividad global. Por ejemplo, donde una especie codifica un producto génico que presenta dos funciones y donde dichas funciones se han separado en distintos genes en una segunda especie, los tres genes y sus correspondientes productos se considera ortólogos. Para la producción acoplada al crecimiento de un producto bioquímico, los expertos en la materia entenderán que el gen ortólogo que hospeda la actividad metabólica que se va a perturbar es el que se va a seleccionar para la construcción del microorganismo no natural. Un ejemplo de ortólogos que presentan actividades separables es cuando distintas actividades se han separado en distintos productos génicos entre dos o más especies o en una única especie. Un ejemplo específico es la separación de la proteólisis de la elastasa y la proteólisis del plasminógeno, dos tipos de actividad serina proteasa, en moléculas distintas como activador del plasminógeno y la elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de la actividad de la 5'-3' exonucleasa de micoplasma y la actividad de la ADN polimerasa III. La ADN polimerasa de la primera especie se puede considerar un ortólogo para cualquiera o ambas exonucleasa o polimerasa de la segunda especie y viceversa.

Por el contrario, los parálogos son homólogos relacionados por, por ejemplo, duplicación seguida de divergencia evolutiva y que tienen funciones similares o comunes, pero no funciones idénticas. Los parálogos pueden originarse o derivarse de, por ejemplo, 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) se pueden considerar parálogos por que representan dos enzimas distintas, que han evolucionado simultáneamente a partir de un ancestro común, que catalizan diferentes reacciones y que tiene funciones distintas en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con una similitud de secuencias significativa entre sí sugiriendo que son homólogos, o relacionadas a través de evolución simultánea a partir de un ancestro común. Los grupos de familias de proteínas parálogas incluyen los homólogos de HipA, genes de la luciferasa, peptidasas, y otros.

El desplazamiento de un gen no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que se puede sustituir por una función génica de una especie diferente a la que se hace referencia. La sustitución incluye, por ejemplo, ser capaz de llevar a cabo sustancialmente la misma función o una función similar en la especie de origen en comparación con la función a la que se hace referencia en la especie diferente. Aunque generalmente, el desplazamiento de un gen no ortólogo se podrá identificar como estructuralmente relacionado con un gen conocido que codifica la función a la que se hace referencia, los genes menos estructuralmente relacionados, pero funcionalmente similares, y sus correspondientes productos genómicos estarán comprendidos, sin embargo, en el 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 la función que se desea sustituir. Por tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parólogo o un gen no relacionado.

Por tanto, en la identificación y construcción del organismo microbiano no natural de la invención, los expertos en la materia entenderán que, aplicando las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento para una especie concreta, la identificación de las modificaciones metabólicas puede incluir la identificación y la inclusión o la inactivación de ortólogos. En la medida en la que los desplazamientos de los genes parálogos y/o no ortólogos están presentes en el microorganismo citado que codifica un enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, los expertos en la materia también pueden utilizar estos genes relacionados evolutivamente.

Los desplazamientos de los genes ortólogos, parálogos y no ortólogos pueden determinarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el examen de las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos de dos polipéptidos revelará la identidad y las similitudes de secuencia entre las secuencias comparadas. Basándose en dichas similitudes, un experto en la materia puede determinar si la similitud es suficientemente alta para indicar que las proteínas están relacionadas evolutivamente a partir de un ancestro común. Algoritmos bien conocidos por expertos en la materia, tales como Align, BLAST, Clustal W y otros comparan y determinan la similitud o identidad de la secuencia en bruto, y determinan también la presencia o significancia de huecos en la secuencia a los que se puede asignar a un peso o puntuación. Dichos algoritmos también son bien conocidos en la técnica y son análogamente aplicables para determinar la similitud o identidad de la secuencia de nucleótidos. Los parámetros de similitud suficiente para determinar el parentesco se calculan basándose en métodos bien conocidos para calcular la similitud estadística, o la posibilidad de encontrar una correspondencia similar en un péptido aleatorio, y la significancia de la correspondencia determinada. Una comparación informática de dos o más secuencias puede, si se desea, optimizarse también visualmente por los expertos en la materia. Puede esperarse que los productos o proteínas génicas relacionadas tengan una similitud elevada, por ejemplo, 25% a 100% de identidad de secuencias. Las proteínas que no están relacionadas pueden tener una identidad que es esencialmente la misma que la que se esperaría que se produjera por azar, si se escaneara una base de datos de suficiente tamaño (aproximadamente 5%). Las secuencias entre 5% y 24% pueden representar o no suficiente homología para

concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. El análisis estadístico adicional para determinar la significancia de dichas correspondencias dado el tamaño del conjunto de datos se puede llevar a cabo para determinar la relevancia de estas secuencias.

5 Los parámetros ilustrativos para determinar el parentesco de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden ser como se muestra a continuación. En resumen, se pueden llevar a cabo las alineaciones de la secuencia de aminoácidos utilizando BLASTP versión 2.0.8 (5 de enero de 1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0; BLOSUM62; apertura de hueco: 11; extensión de hueco: 1; x_desechar: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 3; filtro: on. Se pueden llevar a cabo alineaciones de ácidos nucleicos utilizando BLASTN versión 2.0.6 (16 de septiembre de 1998) y los siguientes parámetros: Correspondencia: 1; correspondencia incorrecta: -2; apertura de hueco: 5; extensión de hueco: 2; x_desechar: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 11; filtro: off. Los expertos en la materia sabrán qué modificaciones se pueden hacer a los anteriores parámetros para aumentar o disminuir el rigor de la comparación, por ejemplo, y determinar el parentesco de dos o más secuencias.

15 La descripción proporciona un biocatalizador microbiano que no se produce naturalmente que incluye un organismo microbiano que tiene una ruta biosintética del ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica la 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, glutamato: semialdehído succínico transaminasa o glutamato decarboxilasa, en el que el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir ácido 4-hidroxibutanoico monomérico (4-HB). La succinil-CoA sintetasa se denomina también succinil-CoA sintasa o succinil CoA ligasa.

25 Los biocatalizadores microbianos que no se producen naturalmente de la divulgación incluyen organismos microbianos que emplean combinaciones de reacciones metabólicas para producir biosintéticamente los compuestos descritos. Los compuestos ilustrativos producidos por los microorganismos no naturales incluyen, por ejemplo, ácido 4-hidroxibutanoico, 1,4-butanodiol y γ -butirolactona. En la figura 1 se ilustran las relaciones de estos compuestos ilustrativos con respecto a la síntesis química o biosíntesis.

30 En un aspecto, se diseña mediante ingeniería genética un organismo microbiano no natural para producir 4-HB. Este compuesto es un punto de entrada útil en la familia de compuestos de 1,4-butanodiol. 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 se muestran en la figura 2.

35 La invención se describe en el presente documento con referencia general a la reacción metabólica, el reactivo o el producto de los mismos, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican un enzima asociada con, o que cataliza, la reacción metabólica, el reactivo o el producto al que se hace referencia. Salvo que se indique de forma expresa lo contrario en el presente documento, los expertos en la materia entenderán que la referencia a una reacción constituye también la referencia a los reactivos y productos de la reacción. De manera similar, salvo que se indique de forma expresa lo contrario en el presente documento, la referencia a un reactivo o producto hace referencia también a la reacción y que la referencia a cualquiera de esta reacción metabólica constituye también una referencia al gen o genes que codifican los enzimas que catalizan la reacción, el reactivo o el producto al que se hace referencia. Del mismo modo, dados los campos bien conocidos de la bioquímica, enzimología y genómica metabólicas, la referencia hecha en el presente documento a un gen o un ácido nucleico codificante constituye también una referencia a la correspondiente enzima codificada y a la reacción que cataliza, así como a los reactivos y productos de la reacción.

45 La producción de 4-HB por medios biosintéticos utilizando los organismos microbianos de la divulgación es especialmente útil debido ya que da como resultado 4-HB monomérico. Los organismos microbianos no naturales de la divulgación y su biosíntesis de compuestos de la familia de 4-HB y BDO es también especialmente útil ya que el producto 4-HB (1) se secreta; (2) está desprovisto de cualesquiera derivatizaciones tales como Coenzima A; (3) evita los cambios termodinámicos durante la biosíntesis, y (4) permite la conversión química espontánea de 4-HB a γ -butirolactona (GBL) en un medio con pH ácido. Esta característica se ilustra posteriormente como etapa 7 en la figura 2 y es también especialmente útil para una síntesis o biosíntesis química eficaz de compuestos de la familia BDO tales como 1,4-butanodiol y/o tetrahidrofurano (THF), por ejemplo.

55 Los organismos microbianos carecen generalmente de la capacidad de sintetizar 4-HB y, por tanto, cualquiera de los compuestos que se muestran en la figura 1 son conocidos por estar comprendidos en la familia de compuestos del 1,4-butanodiol o conocidos por los expertos en la materia por estar comprendidos en la familia de compuestos del 1,4-butanodiol. Además, los organismos que tienen todas las capacidades enzimáticas metabólicas necesarias no son conocidos por producir 4-HB a partir de los enzimas descritos y las rutas bioquímicas ilustradas en el presente documento. Más bien, con la posible excepción de unos pocos microorganismos anaerobios descritos adicionalmente a continuación, los microorganismos que tienen la capacidad enzimática utilizan 4-HB como sustrato para producir, por ejemplo, succinato. Por el contrario, los organismos microbianos no naturales divulgados generan 4-HB como producto. Tal como se ha descrito anteriormente, la biosíntesis de 4-HB en su forma monomérica no es solo particularmente útil en la síntesis de la familia de compuestos de BDO, también permite la biosíntesis adicional de compuestos de la familia de BDO y evita en conjunto los procedimientos de síntesis química.

70 Los organismos microbianos no naturales que pueden producir 4-HB monomérico se producen asegurando que un organismo hospedador microbiano incluye capacidades funcionales para la síntesis bioquímica completa de al menos una ruta biosintética de 4-HB de la divulgación. Asegurar al menos que una ruta biosintética de 4-HB

obligatoria confiere capacidad de biosíntesis de 4-HB sobre el organismo microbiano hospedador.

Se ilustran en el presente documento tres requisitos de las rutas biosintéticas de 4-HB que se muestran a fines ilustrativos en la figura 2. Un requisito de la ruta biosintética de 4-HB incluye la biosíntesis de 4-HB a partir de succinato. Los enzimas que participan en esta ruta de 4-HB incluyen la semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA y la 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa. Otro requisito de la ruta biosintética de 4-HB incluye la biosíntesis del succinato a través de la succinil-CoA. Los enzimas que participan en esta ruta de 4-HB incluyen la succinil-CoA sintetasa, la semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y la 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa. Un tercer requisito de la ruta biosintética de 4-HB incluye la biosíntesis de 4-HB a partir de α -cetoglutarato. Los enzimas que participan en esta ruta biosintética de 4-HB incluyen glutamato:semialdehído succínico transaminasa, glutamato decarboxilasa y 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa. Cada una de estas rutas biosintéticas de 4-HB, sus sustratos, reactivos y productos se describen además adicionalmente en los Ejemplos.

Los organismos microbianos no naturales divulgados se pueden producir introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican una o más de los enzimas que participan en una o más rutas biosintéticas de 4-HB. Dependiendo del organismo microbiano hospedador seleccionado para la biosíntesis, se pueden expresar los ácidos nucleicos para alguna o todas las rutas biosintéticas de 4-HB concretas. Por ejemplo, si un hospedador seleccionado es deficiente en ambas enzimas de la ruta del succinato a 4-HB (la ruta del succinato), y esta ruta se selecciona para la biosíntesis de 4-HB, entonces se introducen ácidos nucleicos expresables de la semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA y la 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa en el hospedador para la posterior expresión exógena. Como alternativa, si el hospedador seleccionado es deficiente en 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, entonces se necesita un ácido nucleico codificante de esta enzima para conseguir la biosíntesis de 4-HB.

De manera análoga, cuando se selecciona la biosíntesis de 4-HB para producirse a través de la ruta del succinato a succinil-CoA (la ruta de la succinil-CoA), los ácidos nucleicos que codifican las deficiencias del hospedador respecto a los enzimas succinil CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y/o 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa deben expresarse exógenamente en el hospedador receptor. La selección de la biosíntesis de 4-HB a través de la ruta del α -cetoglutarato al semialdehído succínico (la ruta del α -cetoglutarato) utilizará la expresión exógena para cubrir las deficiencias del hospedador respecto a una o más de los enzimas glutamato: semialdehído succínico transaminasa, glutamato decarboxilasa y/o 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa.

Dependiendo de los constituyentes de la ruta biosintética de 4-HB de un organismo microbiano hospedador seleccionado divulgado, los biocatalizadores de 4-HB microbianos no naturales incluirán al menos un ácido nucleico que codifica una ruta de 4-HB expresada exógenamente y hasta los ácidos nucleicos que codifican las seis rutas de 4-HB. Por ejemplo, se puede establecer la biosíntesis de 4-HB a partir de las tres rutas en un hospedador deficiente en 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa mediante la expresión exógena de un ácido nucleico que codifica una 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa. Por el contrario, se puede establecer la biosíntesis de 4-HB a partir de las tres rutas en un hospedador deficiente en las seis enzimas mediante la expresión exógena de las seis semialdehído succínico deshidrogenasas independientes de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, glutamato: semialdehído succínico transaminasa, glutamato decarboxilasa y 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa.

Con las enseñanzas y directrices que se proporcionan en el presente documento, los expertos en la materia entenderán que el número de ácidos nucleicos codificantes que se introducen en una forma expresable serán equivalentes a las deficiencias de la ruta de 4-HB del organismo microbiano hospedador seleccionado. Por tanto, un organismo microbiano no natural de la divulgación puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis ácidos nucleicos codificantes que codifican las anteriores enzimas que constituyen las rutas biosintéticas de 4-HB. En algunos aspectos, los organismos microbianos no naturales pueden incluir también otras modificaciones genéticas que facilitan u optimizan la biosíntesis de 4-HB o que transmiten otras funciones útiles para el organismo microbiano hospedador. Una de dichas funcionalidades adicionales puede incluir, por ejemplo, el aumento de la síntesis de uno o más de los precursores de la ruta de 4-HB tal como succinato, succinil-CoA y/o α -cetoglutarato.

En algunos aspectos, un organismo microbiano no natural de la divulgación se genera a partir de un hospedador que contiene la capacidad enzimática de sintetizar 4-HB. En este aspecto específico puede ser útil aumentar la síntesis o la acumulación de un producto de la ruta de 4-HB hasta, por ejemplo, impulsar las reacciones de la ruta de 4-HB hacia la producción de 4-HB. La síntesis aumentada o acumulación se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, la sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifican una o más de los enzimas de la ruta de 4-HB anteriormente descrita. Se puede producir la sobreexpresión del enzima o enzimas de la ruta de 4-HB, por ejemplo, mediante la expresión exógena del gen o genes endógenos, o mediante la expresión exógena del gen o genes heterólogos. Por tanto, los organismos que se producen naturalmente pueden generarse fácilmente para convertirse en organismos microbianos no naturales productores de 4-HB de la invención mediante la sobreexpresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco o los seis ácidos nucleicos que codifican los enzimas de la ruta biosintética de 4-HB. Además, se puede generar un organismo no natural mediante mutagénesis de un gen endógeno que da como resultado un aumento en la actividad de un enzima en la ruta biosintética de 4-HB.

En aspectos especialmente útiles, se emplea la expresión exógena. La expresión exógena confiere la capacidad de personalizar la expresión y/ los elementos reguladores del hospedador y la aplicación para conseguir un nivel de expresión deseado que controla el usuario. Sin embargo, se puede utilizar también la expresión endógena en otros aspectos tales como mediante la eliminación de un efector regulador negativo o la inducción del promotor del gen

cuando se une a un promotor inducible u otro elemento regulador. Por tanto, un gen endógeno que tiene un promotor inducible que se produce naturalmente puede regularse por exceso proporcionado el agente inductor adecuado, o la región reguladora de un gen endógeno se puede genomanipular para incorporar un elemento regulador inducible, permitiendo por tanto la regulación de la expresión aumentada de un gen endógeno en el tiempo deseado. De manera similar, se puede incluir un promotor inducible como un elemento regulador de un gen exógeno introducido en un organismo microbiano no natural (véase el Ejemplo II).

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 hospedador. Por tanto, el término tal como se usa en referencia a la 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 en referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo hospedador de referencia. La fuente puede ser, por ejemplo, ácidos nucleicos homólogos o heterólogos codificantes que expresan la actividad a la que se hace referencia tras su introducción en el organismo microbiano hospedador. Por tanto, el término "endógeno" se refiere a una molécula o actividad a la que se hace referencia que está presente en el hospedador. De manera similar, el término, cuando se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenido en el organismo microbiano. El término "heterólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente diferente de la de la especie a la que se hace referencia mientras que "homólogo" se refiere a una molécula o actividad derivada del organismo microbiano hospedador. De acuerdo con ello, la expresión exógena de un ácido nucleico codificante de la invención puede utilizar un ácido nucleico homólogo o heterólogo codificante.

Las fuentes de ácidos nucleicos codificantes de un enzima de la ruta de 4-HB pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie donde el producto génico codificado es capaz de catalizar la reacción a la que se hace referencia. Dichas especies incluyen organismos procariotas y eucariotas que incluyen, aunque no de forma limitativa, bacterias, incluyendo archaeas y eubacterias, y eucariotas, incluyendo levaduras, plantas, insectos, animales, y mamíferos, incluyendo seres humanos. Por ejemplo, los organismos microbianos que tienen producción biosintética de 4-HB se ilustran en el presente documento con referencia a *E. coli* y levaduras hospedadoras. Sin embargo, con la secuencia genómica completa disponible ahora para más de 550 especies (con más de la mitad de estas disponibles en bases de datos públicas tales como la NCBI), que incluyen 395 genomas de microorganismos y una variedad de genomas de levaduras, hongos, plantas, y mamíferos, la identificación de los genes que codifican la actividad biosintética de 4-HB necesaria para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, incluyendo por ejemplo, desplazamientos de genes homólogos, ortólogos, parálogos y no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos es rutinario y bien conocido en la técnica. De acuerdo con ello, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de 4-HB y otros compuestos descritos en el presente documento con referencia a un organismo concreto tal como *E. coli* o levadura pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas análogos. Con las enseñanzas y directrices que se proporcionan en el presente documento, los expertos en la materia sabrán que una alteración metabólica ilustrada en un organismo se puede aplicar igualmente a otros organismos.

En algunos casos, tales como cuando existe una ruta biosintética de 4-HB alternativa en una especie no relacionada, se puede conferir la biosíntesis de 4-HB a la especie hospedadora mediante, por ejemplo, la expresión exógena de un parólogo o parálogos de la especie no relacionada que cataliza una reacción metabólica similar pero no idéntica para sustituir a la reacción a la que se hace referencia. Como existen determinadas diferencias entre redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la materia entenderán que puede diferir la utilización de genes reales entre diferentes organismos. Sin embargo, con las enseñanzas y directrices que se proporcionan en el presente documento, los expertos en la materia entenderán también que las enseñanzas y métodos descritos se pueden aplicar a todos los organismos microbianos que utilizan alteraciones metabólicas análogas a las ilustradas en el presente documento para construir un organismo microbiano en una especie de interés que sintetizará el 4-HB monomérico.

Se pueden seleccionar organismos microbianos hospedadores a partir de, y los organismos microbianos no naturales generarse en, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos o cualquiera de una variedad de diferentes microorganismos aplicable a los procesos de fermentación. Las bacterias ilustrativas incluyen especies seleccionadas entre *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 ilustrativos incluyen especies seleccionadas entre *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Pichia pastoris*.

Se pueden llevar a cabo métodos para construir y ensayar los niveles de expresión de un hospedador productor de 4-HB que no se produce naturalmente, por ejemplo, por métodos recombinantes y de detección bien conocidos en la materia. Se pueden encontrar descritos dichos métodos en, por ejemplo, Sambrook y col., 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). 4-HB y GBL se pueden separar mediante, por ejemplo, HPLC usando una columna Spherisorb 5 ODS 1 y una fase móvil de tampón fosfato 10 mM al 70% (pH=7) y metanol al 30%, y detectarse con un detector UV a 215 nm (Hennessy et al. J. Forensic Sci. 46(6):1-9 (2004)). BDO se detecta mediante cromatografía gaseosa o mediante HPLC y un detector de índice de refracción utilizando 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)).

Los organismos microbianos no naturales divulgados se construyen utilizando métodos bien conocidos en la técnica como se ilustra anteriormente para expresar de forma exógena al menos un ácido nucleico que codifica un enzima de una ruta de 4-HB en cantidades suficientes para producir 4-HB monomérico. Los niveles ilustrativos de expresión de enzimas 4-HB en cada ruta se describen adicionalmente a continuación en los Ejemplos. Siguiendo las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los organismos microbianos no naturales divulgados pueden conseguir la biosíntesis del 4-HB monomérico dando como resultado concentraciones intracelulares entre aproximadamente 0,1-25 mM o más. En general, la concentración intracelular de 4-HB monomérico está 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. Las concentraciones intracelulares entre y por encima de cada uno de estos intervalos ilustrativos puede conseguirse también a partir de los organismos microbianos que no se producen naturalmente de la divulgación.

Como se describe adicionalmente a continuación, una condición de crecimiento ilustrativa para conseguir la biosíntesis de 4-HB incluye condiciones de cultivo o fermentación anaerobias. En determinados aspectos, los organismos microbianos que no se producen naturalmente divulgados se pueden mantener, cultivar o fermentar en condiciones de cultivo anaerobias o sustancialmente anaerobias. En resumen, las condiciones anaerobias se refieren a un entorno desprovisto de oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaerobias incluyen, por ejemplo, un cultivo, una fermentación discontinua o continua de tal manera que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanezca entre 0 y 10% de saturación. Las condiciones sustancialmente anaerobias incluyen también células en crecimiento o en reposo en un medio líquido o en agar sólido en el interior de una cámara precintada mantenida con una atmósfera de menos de un 1% de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede mantenerse mediante, por ejemplo, burbujeo en el cultivo una mezcla de N₂/CO₂ u otro gas o gases no de oxígeno adecuados.

La descripción divulga también un biocatalizador microbiano que no se produce naturalmente que incluye un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas del ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica la 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, 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 cantidad suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO).

Se pueden generar también organismos microbianos que no se produce naturalmente que biosintetizan BDO. Siguiendo las enseñanzas y directrices proporcionadas anteriormente para la construcción de organismos microbianos que sintetizan 4-HB, se pueden incorporar rutas de BDO adicionales en los organismos microbianos productores de 4-HB para generar organismos que sintetizan también BDO y otros compuestos de la familia BDO. En la figura 3 se ilustra la síntesis química de BDO y sus productos posteriores. Los organismos microbianos no naturales de la invención capaces de la biosíntesis de BDO evitan esta síntesis química utilizando 4-HB como punto de entrada como se ilustra en la figura 2. Como se describe adicionalmente a continuación, se pueden usar productores de 4-HB para convertir químicamente 4-HB en GBL y a continuación, en BDO o THF, por ejemplo. Como alternativa, se pueden modificar adicionalmente los productores de 4-HB para incluir capacidades biosintéticas para la conversión de 4-HB y/o GBL en BDO.

Las rutas de BDO adicionales a introducir en productores de 4-HB incluyen, por ejemplo, la expresión exógena en un fondo de hospedador deficiente o la sobreexpresión de una aldehído deshidrogenasa independiente de CoA, aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA o alcohol deshidrogenasa. En ausencia de la acil-CoA sintetasa endógena capaz de modificar 4-HB, los organismos microbianos productores de BDO que no se producen naturalmente pueden incluir además una acil-CoA sintetasa exógena selectiva para 4-HB. En la Tabla 1 a continuación se relacionan alcohol y aldehído deshidrogenasas ilustrativos que se pueden usar para estas conversiones in vivo de 4-HB a BDO.

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

ALCOHOL DESHIDROGENASAS

ec: 1.1.1.1	alcohol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.2	alcohol deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.1.1.4	(R,R)-butanodiol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.5	acetoina deshidrogenasa
ec: 1.1.1.6	glicerol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.7	propanodiol-fosfato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.8	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD+)
ec: 1.1.1.11	D-arabinitol 4-deshidrogenasa
ec: 1.1.1.12	L-arabinitol 4-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

ES 2 583 179 T3

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-hidroxi-2-butanato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.31	3-hidroxi-2-butanato 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-descarboxilante)
ec: 1.1.1.39	malato deshidrogenasa (descarboxilante)
ec: 1.1.1.40	malato deshidrogenasa (oxaloacetato-descarboxilante) (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-hidroxi-2-butanato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.60	2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa
ec: 1.1.1.61	4-hidroxi-2-butanato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.66	omega-hidroxidecanoato 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: 1.1.1.78	metilglioxal reductasa (dependiente de NADH)
ec: 1.1.1.79	glioxilato reductasa (NADP+)
ec: 1.1.1.80	isopropanol deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.1.1.81	hidroxipiruvato reductasa
ec: 1.1.1.82	malato deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.1.1.83	D-malato deshidrogenasa (descarboxilante)
ec: 1.1.1.84	dimetilmalato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.85	3-isopropilmalato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.86	cetol-ácido reductoisomerasa
ec: 1.1.1.87	homoisocitrato deshidrogenasa
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 (descarboxilante)
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-2-butanato 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	indololactato 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	perilil-alcohol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.156	glicerol 2-deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.1.1.157	3-hidroxi-2-butanato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.163	ciclopentanol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.164	hexadecanol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.165	2-alquil-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

ES 2 583 179 T3

ec: 1.1.1.177	glicerol-3-fosfato-1-deshidrogenasa (NADP+)
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 deshidrogenasa de cadena larga
ec: 1.1.1.194	coniferil-alcohol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.195	cinnamil-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-hidroxibutirato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.222	(R)-4-hidroxifenillactato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.223	isopiperitenol deshidrogenasa
ec: 1.1.1.226	4-hidroxiciclohexanocarboxilato deshidrogenasa
ec: 1.1.1.229	dietil 2-metil-3-oxosuccinato 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	metilglioxal 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: 1.2.1.5	aldehído deshidrogenasa [NAD(P)+]
ec: 1.2.1.7	benzaldehído deshidrogenasa (NADP+)
ec: 1.2.1.8	betaina-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	semialdehído de aspartato 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	semialdehído de malonato deshidrogenasa
ec: 1.2.1.16	semialdehído de succinato deshidrogenasa [NAD(P)+]
ec: 1.2.1.17	glioxilato deshidrogenasa (acilante)
ec: 1.2.1.18	semialdehído de malonato-deshidrogenasa (acetilante)
ec: 1.2.1.19	aminobutiraldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.20	semialdehído de glutarato-deshidrogenasa
ec: 1.2.1.21	glicolaldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.22	lactaldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.23	2-oxoaldehído deshidrogenasa (NAD+)
ec: 1.2.1.24	semialdehído de succinato-deshidrogenasa
ec: 1.2.1.25	2-oxoisovalerato deshidrogenasa (acilante)
ec: 1.2.1.26	2,5-dioxovalerato deshidrogenasa
ec: 1.2.1.27	semialdehído de metilmalonato 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	semialdehído de L-aminoadipato deshidrogenasa
ec: 1.2.1.32	semialdehído de aminomuconato 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: 1.2.1.45	4-carboxi-2-hidroximuconato-6- semialdehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.46	formaldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.47	4-trimetilamoniobutiraldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.48	aldehído deshidrogenasa de cadena larga
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: 1.2.1.59	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	vanillin deshidrogenasa
ec: 1.2.1.68	coniferil-aldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.69	fluoroacetaldehído deshidrogenasa
ec: 1.2.1.71	semialdehído de succinilglutamato deshidrogenasa

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

- 5 El diseño y la construcción de los organismos microbianos genéticamente modificados se lleva a cabo usando métodos bien conocidos en la técnica para conseguir suficientes cantidades de expresión para producir BDO. En particular, los organismos bacterianos no naturales de la invención pueden conseguir la biosíntesis de BDO dando como resultado concentraciones intracelulares entre aproximadamente 0,1-25 mM o más. En general, la concentración intracelular de BDO está 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. Las concentraciones intracelulares entre y por encima de cada uno de estos intervalos ilustrativos pueden conseguirse también a partir de los organismos microbianos no naturales de la invención. Como con los productores de 4-HB, los productores de BDO también se pueden mantener, cultivar o fermentar en condiciones anaerobias.
- 10 Se describe además un método para la producción de 4-HB. El método incluye cultivar un organismo microbiano que no se produce naturalmente que tiene una ruta biosintética del ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica la 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, glutamato: semialdehído succínico transaminasa o glutamato decarboxilasa en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir ácido 4-hidroxibutanoico monomérico (4-HB). El método puede incluir adicionalmente la conversión química de 4-HB a GBL y de BDO o THF, por ejemplo.

Se entiende que, en los métodos descritos en el presente documento, cualquiera del uno o más ácidos nucleicos exógenos se puede combinar en un organismo microbiano no naturales divulgado siempre que se produzca el producto deseado, por ejemplo, 4-HB, BDO, THF o GBL. Por ejemplo, un organismo microbiano no natural que tiene una ruta biosintética de 4-HB puede comprender al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican los enzimas deseadas, de tal manera que la combinación de 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa y la semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA; 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa y la semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA; la semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y la succinil-CoA sintetasa; succinil-CoA sintetasa y glutamato decarboxilasa, y similares. Por tanto, se entiende que cualquier combinación de dos o más enzimas de una ruta biosintética puede estar incluida en un organismo microbiano no natural de la divulgación. De manera similar, se entiende que cualquier combinación de tres o más enzimas de una ruta biosintética puede estar incluida en un organismo microbiano no natural divulgados, por ejemplo, 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA y succinil-CoA sintetasa; 4-hidroxibutanoato 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 dé como resultado la producción del correspondiente producto deseado.

Cualquiera de los organismos microbianos que no se producen naturalmente descritos anteriormente puede cultivarse para producir los productos biosintéticos descritos. Por ejemplo, los productores de 4-HB pueden cultivarse para la producción biosintética de 4-HB. El 4-HB puede estar aislado o tratarse como se describe a continuación para generar GBL, THF y/o BDO. De manera similar, los productores de BDO pueden cultivarse para la producción biosintética de BDO. El BDO se puede aislar o someterse a tratamientos adicionales para la síntesis química de la familia de compuestos de BDO tales como los compuestos posteriores ilustrados en la figura 3.

En algunos aspectos, las condiciones de cultivo incluyen crecimiento anaerobio o sustancialmente anaerobio o

condiciones de mantenimiento. Se han descrito las condiciones anaerobias ilustrativas anteriormente y son bien conocidas en la técnica. Se describen a continuación en los Ejemplos las condiciones anaerobias ilustrativas para los procesos de fermentación. Puede emplearse cualquiera de estas condiciones con los organismos que no se producen naturalmente, así como otras condiciones anaerobias bien conocidas en la técnica. En dichas condiciones anaerobias, los productores de 4-HB y BDO pueden sintetizar 4-HB y BDO monomérico, respectivamente, a concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más, así como las otras concentraciones ilustradas anteriormente.

Pueden generarse también numerosos compuestos posteriores para organismos bacterianos no naturales productores de 4-HB y BDO de la divulgación. Con respecto a los organismos microbianos productores de 4-HB divulgados, 4-HB y GBL monoméricos se encuentran en equilibrio en el medio de cultivo. La conversión de 4-HB a GBL puede llevarse a cabo eficazmente, por ejemplo, cultivando los organismos microbianos en medio a pH ácido. A pH menor o igual a 7,5, en particular a o por debajo de pH 5,5, 4-HB se convierte espontáneamente en GBL, como se ilustra en la figura 1.

El GBL resultante se puede separar de 4-HB y otros componentes del cultivo usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Dichos métodos de separación incluyen, por ejemplo, los procedimientos de extracción ilustrados en los Ejemplos, así como los métodos que incluyen la extracción líquido-líquido continua, pervaporación, filtración con membrana, separación con membrana, ósmosis inversa, electrodialisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción, y ultrafiltración. Todos los métodos anteriores son bien conocidos en la materia. El GBL separado se puede purificar mediante, por ejemplo, destilación.

Otro compuesto posterior que se puede producir a partir de organismos microbianos no naturales productores de 4-HB de la divulgación incluye, por ejemplo, BDO. Este compuesto se puede sintetizar mediante, por ejemplo, hidrogenación química de GBL. Las reacciones de hidrogenación química son bien conocidas en la técnica. Un procedimiento ilustrativo incluye la reducción química de 4-HB y/o GBL o una mezcla de estos dos componentes que se derivan del cultivo usando un catalizador de hidrogenación heterogéneo u homogéneo junto con hidrógeno, o un agente reductor de tipo hidruro usado estequiométrica o catalíticamente, para producir 1,4-butanodiol.

Son igualmente aplicables otros procedimientos bien conocidos en la técnica para la anterior reacción química e incluye, por ejemplo, el documento WO N° 82/03854 (Bradley, et al.), que describe la hidrogenolisis de la gamma-butirolactona en fase vapor sobre catalizador de óxido de cobre y óxido de cinc. La patente británica n° 1.230.276, que describe la hidrogenación de la gamma-butirolactona usando un catalizador de óxido de cobre-óxido de cromo. La hidrogenación se lleva a cabo en fase líquida. Se ilustran también reacciones discontinuas que tienen presiones totales de reactor elevadas. Las presiones parciales de reactivos y productos en los reactores están también por encima de los respectivos puntos de rocío. La patente británica n° 1.314.126, que describe la hidrogenación de la gamma-butirolactona en fase líquida sobre un catalizador de óxido de níquel-cobalto-torio. Se ilustran reacciones discontinuas teniendo presiones totales elevadas y presiones parciales de componentes también por encima de los respectivos puntos de rocío de los componentes. La patente británica n° 1.344.557, que describe la hidrogenación de la gamma-butirolactona en fase líquida sobre un catalizador de óxido de cobre-óxido de cromo. Una fase vapor o una fase mixta que contiene vapor se indica como adecuada en algunos casos. Se ilustra un reactor tubular de flujo continuo utilizando presiones totales del reactor elevadas. La patente británica n° 1.512.751, que describe la hidrogenación de la gamma-butirolactona a 1,4-butanodiol en fase líquida sobre un catalizador de óxido de cobre-óxido de cromo. Se ilustran reacciones discontinuas que tienen presiones totales de reactor elevadas y, cuando sea determinable, las presiones parciales de reactivos y productos estarán también por encima de los respectivos puntos de rocío. La patente de Estados Unidos n° 4.301.077, que describe la hidrogenación a 1,4-butanodiol de la gamma-butirolactona sobre un catalizador de Ru--Ni--Co--Zn. La reacción se puede llevar a cabo en fase líquida o fase gaseosa o en una fase líquido-gas mixta. Se ilustran reacciones en fase líquida de flujo continuo a presiones totales del reactor elevadas y productividades de reactor relativamente bajas. La patente de Estados Unidos n° 4.048.196, que describe la producción de 1,4-butanodiol mediante la hidrogenación en fase líquida de gamma-butirolactona sobre un catalizador de óxido de cobre-óxido de cinc. Se ilustra además un reactor tubular de flujo continuo que funciona a presiones totales de reactor elevadas y a presiones parciales de reactivos y productos elevadas. Y la patente de Estados Unidos n° 4.652.685, que describe la hidrogenación de lactonas a glicoles.

Un compuesto posterior adicional que se puede producir a partir de organismos microbianos no naturales productores de 4-HB de la divulgación incluye, por ejemplo, THF. Este compuesto se puede sintetizar mediante, por ejemplo, hidrogenación química de GBL. Un procedimiento ilustrativo bien conocido en la técnica aplicable para la conversión de GBL a THF incluye, por ejemplo, la reducción química de 4-HB y/o GBL o una mezcla de estos dos componentes que se derivan del cultivo usando un catalizador de hidrogenación heterogéneo u homogéneo junto con hidrógeno, o un agente reductor de tipo hidruro usado estequiométrica o catalíticamente, para producir tetrahidrofurano. Son igualmente aplicables otros procedimientos bien conocidos en la técnica para la anterior reacción química e incluyen, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n° 6.686.310, que describe una ruta sol-gel de área superficial elevada preparada para catalizadores de hidrogenación. Se describen también procesos para la reducción de gamma-butirolactona a tetrahidrofurano y 1,4-butanodiol.

Las condiciones de cultivo pueden incluir, por ejemplo, procedimientos de cultivo líquido, así como fermentación y otros procedimientos de cultivo a gran escala. Como se describe adicionalmente a continuación en los Ejemplos, se pueden obtener rendimientos particularmente útiles de los productos biosintéticos de la divulgación en condiciones de cultivo anaerobias o sustancialmente anaerobias.

Se proporciona además un método de fabricación de 4-HB. El método incluye fermentar un organismo microbiano que no se produce naturalmente que tiene una ruta biosintética del ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica la 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, glutamato: semialdehído succínico transaminasa o glutamato decarboxilasa en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir ácido 4-hidroxi-butanoico monomérico (4-HB), comprendiendo el proceso una fermentación de alimentación discontinua y una separación discontinua; fermentación de alimentación discontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua.

El cultivo y las hidrogenaciones químicas descritas anteriormente se pueden escalar hasta y crecer de forma continua para fabricar 4-HB, GBL, BDO y/o THF. Los procedimientos de crecimiento ilustrativos incluyen, por ejemplo, fermentación de alimentación discontinua y separación discontinua; fermentación de alimentación discontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procesos son bien conocidos en la técnica. Emplear los productores de 4-HB permite la biosíntesis simultánea de 4-HB y la conversión química en GBL, BDO y/o THF empleando los anteriores procedimientos de hidrogenación simultáneos con métodos de cultivos continuos tales como fermentación. Son también conocidos en la técnica otros procedimientos de hidrogenación y se pueden aplicar igualmente a los métodos divulgados.

Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción biosintética de cantidades comerciales de 4-HB y/o BDO. En general, y como con procedimientos de cultivo no continuos, la producción continua y/o casi continua de 4-HB o BDO incluirá cultivar un organismo productor de 4-HB o BDO no natural de la divulgación en nutrientes y medio suficientes para sostener y/o sostener casi el crecimiento en fase exponencial. El cultivo continuo en dichas condiciones puede incluir, por ejemplo, 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o más. Además, el cultivo continuo puede incluir 1 semana, 2, 3, 4 o 5 o más semanas y hasta varios meses. Como alternativa, los organismos descritos en el presente documento pueden cultivarse durante horas, si resulta adecuado para una aplicación concreta. Debe entenderse que las condiciones de cultivo continuas y/o casi continuas pueden incluir también todos los intervalos de tiempo entre estos periodos ilustrativos.

Son bien conocidos en la técnica los procedimientos de fermentación. En resumen, la fermentación para la producción biosintética de 4-HB, BDO u otros productos derivados de 4-HB de la divulgación se puede utilizar en, por ejemplo, fermentación de alimentación discontinua y separación discontinua; fermentación de alimentación discontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Los ejemplos de procedimientos de fermentación discontinua y continua bien conocidos en la técnica se ilustran adicionalmente a continuación en los Ejemplos.

Además, con respecto a los procedimientos de fermentación anteriores utilizando los productores de 4-HB o BDO de la divulgación para la producción continua de cantidades sustanciales de 4-HB y BDO monoméricos, respectivamente, los productores de 4-HB también pueden, por ejemplo, someterse simultáneamente a procedimientos de síntesis química como se ha descrito anteriormente para la conversión química del 4-HB monomérico en, por ejemplo, GBL, BDO y/o THF. Los productores de BDO pueden, de manera similar, por ejemplo, someterse simultáneamente a procedimientos de síntesis química como se ha descrito anteriormente para la conversión química de BDO en, por ejemplo, THF, GBL, pirrolidonas y/u otros compuestos de la familia BDO. Además, los productos de los productores de 4-HB y BDO pueden separarse del cultivo de fermentación y someterse secuencialmente a conversión química, como se divulga en el presente documento.

En resumen, se puede llevar a cabo la hidrogenación de GBL en el caldo de fermentación como se describe en Frost et al., *Biotechnology Progress* 18: 201-211 (2002). Otro procedimiento para la hidrogenación durante la fermentación incluye, por ejemplo, los métodos descritos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.478.952. Este método se ilustra además en los ejemplos siguientes.

Por tanto, la descripción divulga 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 naturalmente que tiene las rutas biosintéticas del ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO), las rutas comprenden al menos un ácido nucleico exógeno que codifica la 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, glutamato descarboxilasa, 1,4-butanodiol semialdehído deshidrogenasa independiente de CoA, 1,4-butanodiol semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA, 1,4-butanodiol alcohol deshidrogenasa, tanto dependiente de CoA como independiente de CoA, en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO), GBL o THF, comprendiendo la fermentación una 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 4-HB, BDO y otros productos de la divulgación como se ha descrito en el presente documento, se pueden utilizar también los organismos microbianos no naturales y los métodos de la invención en diversas combinaciones entre sí y con otros organismos microbianos y métodos bien conocidos en la técnica para conseguir la biosíntesis del producto mediante otras rutas. Por ejemplo, una alternativa para producir BDO diferente que usan los productores de 4-HB y las etapas químicas o diferentes que usan los productores de BDO es directamente mediante la adición de otro organismo microbiano capaz de convertir 4-HB o un producto de 4-HB ilustrado en el presente documento en BDO.

Uno de dichos procedimientos incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano productor de 4-HB de la divulgación para producir 4-HB, como se describe anteriormente y a continuación. A continuación, se puede usar el 4-HB como un sustrato para un segundo organismo microbiano que convierte 4-HB en, por ejemplo, BDO, GBL y/o THF. El 4-HB se puede añadir directamente a otro cultivo del segundo organismo, o el cultivo original de los productores de 4-HB se puede agotar de estos organismos microbianos por, por ejemplo, separación celular, y después, la adición posterior del segundo organismo del caldo de fermentación se puede utilizar para producir el producto final sin etapas de purificación intermedias. Un segundo organismo ilustrativo que tiene la capacidad de utilizar bioquímicamente 4-HB como sustrato para la conversión de BDO, por ejemplo, es *Clostridium acetobutylicum*

(véase, por ejemplo, Jewell et al., Current Microbiology, 13:215-19 (1986)).

En otros aspectos, los organismos microbianos no naturales y los métodos de la divulgación se pueden ensamblar en una amplia variedad de subrutas para conseguir la biosíntesis de, por ejemplo, 4-HB y/o BDO como se ha descrito. En estos aspectos, se pueden segregar rutas biosintéticas para un producto deseado de la invención en diferentes organismos microbianos y los diferentes organismos microbianos se pueden cultivar simultáneamente para producir el producto final. En dicho esquema biosintético, el producto de un organismo microbiano es el sustrato de un segundo organismo microbiano hasta que se sintetiza el producto final. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la biosíntesis de BDO como se ha descrito anteriormente para construir un organismo microbiano que contiene las rutas biosintéticas para la conversión de un sustrato tal como succinato endógeno mediante 4-HB en el producto final BDO. Como alternativa, también puede producirse BDO biosintéticamente a partir de organismos microbianos mediante cultivo simultáneo o fermentación simultánea usando dos organismos en el mismo recipiente. Siendo un primer organismo microbiano un productor de 4-HB con genes para producir 4-HB a partir de ácido succínico, y siendo un segundo organismo microbiano un productor de BDO con genes para convertir 4-HB en BDO.

Con las enseñanzas y directrices que se proporcionan en el presente documento, los expertos en la materia entenderán que existe una amplia variedad de combinaciones y permutaciones de organismos microbianos que no se producen naturalmente y los métodos descritos junto con los otros organismos microbianos, con el cultivo simultáneo de otros organismos microbianos que no se producen naturalmente que tienen subrutas y con combinaciones de otros procedimientos químicos y/o bioquímicos bien conocidos en la técnica para producir productos de 4-HB, BDO, GBL y THF de la divulgación.

Un método informático para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la biosíntesis de un producto es la infraestructura informática OptKnock, Burgard et al., Biotechnol Bioeng, 84: 647-57 (2003). OptKnock es un programa de modelación y simulación metabólica que sugiere estrategias de delección de genes que dan como resultado microorganismos genéticamente estables que producen un exceso del producto diana. Específicamente, la infraestructura examina la totalidad de la red metabólica y/o bioquímica de un microorganismo con el fin de sugerir manipulaciones genéticas que fuercen la bioquímica deseada a ser un subproducto obligatorio del crecimiento celular. Al acoplar la producción bioquímica con el crecimiento de la célula a través de delecciones génicas u otras perturbaciones de los genes funcionales estratégicamente situadas, las presiones de selección sobre el crecimiento impuestas por las cepas diseñadas por ingeniería genética después de largos períodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción bioquímica acoplada al crecimiento obligatoria. Finalmente, cuando se realizan las delecciones génicas, existe una posibilidad poco importante de que las cepas diseñadas reviertan a su estado original porque los genes seleccionados por OptKnock se eliminan completamente del genoma. Por tanto, esta metodología informática se puede utilizar bien para identificar rutas alternativas que conducen a la biosíntesis de 4-HB y/o BDO o bien utilizarse en relación con organismos microbianos no naturales para optimización adicional de la biosíntesis de 4-HB y/o BDO.

En resumen, OptKnock es un término que se utiliza en el presente documento para referirse a un método y sistema informático para modelar el metabolismo celular. El programa OptKnock se refiere a una infraestructura de modelos y métodos que incorporan restricciones concretas a los modelos de análisis del balance de flujo (FBA). Estas restricciones incluyen, por ejemplo, información cinética cualitativa, información cualitativa reguladora, y/o datos experimentales de micromatrices de ADN. OptKnock también calcula soluciones a diversos problemas metabólicos mediante, por ejemplo, estrechar los límites de flujo derivados de los modelos de balance de flujo y, posteriormente, sondear los límites de rendimiento de las redes metabólicas en la presencia de adiciones o delecciones de genes. La infraestructura informática OptKnock permite la construcción de formulaciones modelo que permiten una consulta efectiva de los límites de rendimiento de las redes metabólicas, y proporciona métodos para resolver los problemas de programación lineal entera mixta. Los métodos de modelación y simulación metabólica citados en el presente documento como OptKnock se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense con número de serie 10/043.440, presentada el 10 de enero de 2002, y en la patente internacional n° PCT/US02/00660, presentada el 10 de enero de 2002.

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

SimPheny es un sistema informático que se puede utilizar 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 soluciones que contiene todas y cada una de las posibles funcionalidades de las reacciones químicas del sistema, determinando de esta forma una gama de actividades permitidas por el sistema biológico. Este enfoque se denomina como modelación basada en restricciones, porque el espacio de soluciones está definido por restricciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas, así como por la termodinámica de las reacciones y las restricciones de capacidad asociadas con los flujos máximos a través de las reacciones. El espacio definido por estas restricciones se puede interrogar para determinar las capacidades fenotípica y conductual del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos. Los métodos de análisis tales como el análisis convexo, la programación lineal y el cálculo de rutas extremas descritos, 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), se pueden utilizar para determinar dichas capacidades fenotípicas. Como se describe en los siguientes Ejemplos,

esta metodología de cálculo se utilizó para identificar y analizar las rutas biosintéticas de 4-HB, tanto posibles como óptimas, en organismos microbianos no productores de 4-HB.

Tal como se ha descrito anteriormente, un método basado en restricciones utilizado en los programas informáticos aplicables es el análisis del balance de flujo. En análisis del balance de flujo se basa en equilibrar los flujos en estado estacionario, y se puede implementar como se describe en, por ejemplo, Varma y Palsson, *Biotech. Bioeng.* 12:994-998 (1994). El enfoque del balance de flujo se ha aplicado a redes de reacciones para simular o predecir propiedades sistémicas de, por ejemplo, el metabolismo de los adipocitos tal y como se describe en Fell y Small, *J. Biochem.* 138:781-786 (1986), secreción de acetato desde *E. coli* en condiciones de maximización de ATP como se describe en Majewski y Domach, *Biotech. Bioeng.* 35:732-738 (1990) o la secreción de etanol por levaduras como se describe en Vanrolleghem et al., *Biotech. Prog.* 12:434-448 (1996). Además, este enfoque se puede utilizar para predecir o simular el crecimiento de *E. coli* en una variedad de fuentes de carbono único, así como el metabolismo de *H. influenzae* como se describe en Edwards y Palsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:5528-5533 (2000), Edwards y Palsson, *J. Biol. Chem.* 274:17410-17416 (1999) y Edwards et al., *Nature Biotech.* 19:125-130 (2001).

Una vez que se ha definido el espacio de soluciones, se puede analizar para determinar posibles soluciones en diferentes condiciones. Este enfoque informático es coherente con la realidad biológica porque los sistemas biológicos son flexibles y pueden alcanzar el mismo resultado de muchas formas diferentes. Los sistemas biológicos están diseñados mediante mecanismos evolutivos que han sido restringidos por restricciones fundamentales que deben afrontar todos los sistemas vivos. Por tanto, la estrategia de modelado basado en restricciones abarca estas realidades generales. Además, la capacidad de imponer continuamente restricciones adicionales sobre un modelo de red mediante el endurecimiento de las restricciones da como resultado una reducción en el tamaño del espacio de soluciones, mejorando de esta forma la precisión, por lo que se puede predecir el comportamiento fisiológico o el fenotipo.

Con las enseñanzas y directrices que se proporcionan en el presente documento, un experto en la técnica podrá aplicar diferentes infraestructuras informáticas para la modelación y simulación metabólica para diseñar e implementar la biosíntesis de 4-HB, BDO, GBL, THF y otros compuestos de la familia BDO en organismos hospedadores microbianos diferentes a *E. coli* y levadura. Dichos métodos de modelación y simulación metabólica incluyen, por ejemplo, los sistemas informáticos anteriormente ilustrados como SimPheny® y OptKnock. Para ilustración, algunos métodos se han descrito en el presente documento con referencia a la infraestructura informática OptKnock para modelación y simulación. Los expertos en la materia sabrán cómo aplicar la identificación, diseño e implementación de las alteraciones metabólicas usando OptKnock a cualquiera otra de estas infraestructuras informáticas de modelación y simulación y métodos bien conocidos en la técnica.

La capacidad de una célula u organismo para producir un producto bioquímico de forma biosintética se puede ilustrar en el contexto de los límites de producción bioquímica de una red metabólica típica calculada usando un modelo *in silico*. Estos límites se obtienen fijando la tasa o tasas de recaptación del sustrato o sustratos limitantes a sus valores experimentalmente determinados, y calculando las tasas máximas y mínimas de producción bioquímica para cada nivel de crecimiento que se puede alcanzar. La producción de un producto bioquímico deseado generalmente está en competencia directa con la formación de recursos intracelulares. En estas circunstancias, una velocidad de producción bioquímica mejorada necesariamente dará como resultado tasas de crecimiento inferiores a las máximas. Las desactivaciones sugeridas mediante los programas de modelación y simulación metabólica tales como OptKnock están diseñadas para restringir los límites de la solución permitidos, forzando un cambio en el comportamiento metabólico de la cepa natural. Aunque los límites reales de solución para una cepa dada se ampliarán o se restringirán a medida que la tasa o tasas de recaptación de sustrato aumenten o disminuyan, cada punto experimental estará dentro de los límites de la solución calculada. Las representaciones gráficas, tales como las que permiten predicciones exactas de lo cerca que están las cepas diseñadas de sus límites de comportamiento también indican todo lo que se puede mejorar.

La infraestructura matemática OptKnock se ilustra en el presente documento para detectar delecciones de genes que llevan a la biosíntesis de productos y, particularmente, a la biosíntesis de productos acoplada con el crecimiento. El procedimiento construye un modelo metabólico basado en restricciones que estrecha la gama de posibles fenotipos que puede mostrar un sistema celular mediante la imposición sucesiva de restricciones fisicoquímicas de control, Price et al., *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 886-97 (2004). Tal como se ha descrito anteriormente, los modelos y simulaciones basados en restricciones son bien conocidos en la técnica y por lo general implican la optimización de una diana celular específica, sometida a la estequiometría de la red, para sugerir una distribución de flujo probable.

En resumen, la maximización de un objetivo celular cuantificado como flujo de reacción agregado para una red metabólica estacionaria 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 forma:

maximizar
sometido a

Vobjetivo celular

$$\sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0,$$

$V_{\text{sustrato}} = v_{\text{sustrato_captación}}$ mmol/gDW·h

$$\forall i \in N$$

$$\forall i \in \{\text{sustrato(s) limitante(s)}\}$$

$$v_{atp} \geq v_{atp_principal} \text{ mmol/gDW} \cdot h$$

$$v_j \geq 0$$

$$\forall i \in \{\text{reacción irrev.}\}$$

donde S_{ij} es el coeficiente estequiométrico del metabolito i en la reacción j , v_j es el flujo de la reacción j , $v_{\text{sustrato_captación}}$ representa la tasa o tasas de recaptación teóricas o medidas del sustrato o sustratos limitantes, y $v_{atp_principal}$ es el ATP de mantenimiento necesario no asociado al crecimiento. El vector v incluye tanto los flujos internos como los externos. En este estudio, se considera frecuentemente que el objetivo celular es la obtención de precursores biosintéticos en las proporciones necesarias 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, lxxvi). Los flujos por lo general se indican por 1 gDW·h (gramo de peso seco multiplicado por hora) de tal manera que la formación de la biomasa se expresa como g de biomasa producida/gDW·h o 1/h.

El modelado de las delecciones génicas, y dicha eliminación de reacciones, utiliza en primer lugar la incorporación de variables binarias a la estructura teórica basada en restricciones, Burgard et al., Biotechnol. Bioeng., 74: 364-375 (2001), Burgard et al., Biotechnol. Prog., 17: 791-797 (2001). Estas variables binarias

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

suponen un valor de 1 si la reacción j está activa y un valor de 0 si está inactiva. La siguiente restricción,

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

garantiza que el flujo de la reacción, v_j , se ajusta a cero solamente si la variable y_j es igual a cero. Como alternativa, cuando y_j es igual a uno, v_j puede tomar cualquier valor entre un límite inferior $v_j^{\min}$ y un límite superior $v_j^{\max}$. En el presente documento, $v_j^{\min}$ y $v_j^{\max}$ se identifican minimizando y maximizando, respectivamente, cada flujo de reacción sometido a las restricciones de la red anteriormente descritas, Mahadevan et al., Metab. Eng., 5: 264-76 (2003).

Las desactivaciones de genes/reacciones óptimas se identifican resolviendo un problema de optimización de dos niveles que selecciona el conjunto de reacciones activas ($y_j=1$) de tal forma que una solución de crecimiento óptimo de la red resultante produce un exceso del producto químico de interés. Desde el punto de vista matemático, este problema de optimización de dos niveles se expresa en forma del siguiente problema de optimización entero mixto de dos niveles:

$$\begin{array}{l}
 \text{Maximizar} \\
 v_j \\
 \text{sometido a} \\
 v_j
 \end{array}
 \left(
 \begin{array}{l}
 \text{Vquímica} \\
 \text{maximizar} \\
 \text{sometido a} \\
 \sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0, \quad \forall i \in N \\
 V_{\text{sustrato}} = \\
 V_{\text{sustrato_captación}} \\
 V_{\text{atp}} \geq V_{\text{atp_principal}}
 \end{array}
 \right)
 \begin{array}{l}
 \text{(OptKnock)} \\
 V_{\text{biomasa}} \\
 \forall i \in \{\text{sustrato(s)} \\
 \text{limitante(s)}\}
 \end{array}
 \right)$$

$$V_{\text{Biomasa}} \geq V_{\text{biomasa diana}}$$

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

$$\sum_{j \in M_{\text{forward}}} (1 - y_j) = K$$

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

donde $v_{\text{química}}$ es la producción del producto diana deseado, por ejemplo, succinato u otro producto bioquímico, y K es el número de desactivaciones permisibles. Destacar que poner el valor de K en cero devuelve la solución de biomasa máxima de la red completa, mientras que poner el valor de K en uno identifica la única desactivación de gen/reacción ($y_j = 0$) de tal forma que la red resultante implica la máxima sobreproducción dado su máximo rendimiento de biomasa. La restricción final garantiza que la red resultante cumple un mínimo rendimiento de biomasa. Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 84: 647-57 (2003), proporcionan una descripción más detallada de la formulación del modelo y del procedimiento de resolución. Los problemas que contienen cientos de variables binarias se pueden resolver en unos pocos minutos o en varias horas usando CPLEX 8.0, GAMS: The Solver Manuals. 2003: GAMS Development Corporation, que se puede acceder a través de GAMS, Brooke et al., GAMS Development Corporation (1998), un entorno de modelado, en una estación de trabajo IBM RS6000-270. La infraestructura OptKnock ya ha sido capaz de identificar estrategias de delección de genes prometedoras para la producción bioquímica en exceso, Burgard et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 84: 647-57 (2003), Pharkya et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 84: 887-899 (2003), y establece un marco sistemático que abarca de forma natural futuras mejoras en marcos de modelización metabólica y reguladora.

Cualquier solución del problema OptKnock de dos niveles anteriormente descrito proporcionará un conjunto de reacciones metabólicas a perturbar. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto o la modificación metabólica puede dar como resultado 4-HB o BDO como producto obligado durante la fase de crecimiento del organismo. Como las reacciones son conocidas, una solución del problema OptKnock de dos niveles también proporcionará el gen o genes asociados que codifican 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 los enzimas que participan en cada reacción es generalmente un proceso automatizado, que se realiza mediante la correlación de las reacciones con una base de datos de reacciones que incluye relaciones entre enzimas y genes codificantes.

Una vez identificado, el conjunto de reacciones a perturbar para obtener la producción de 4-HB o BDO se implementa en la célula u organismo diana mediante la perturbación funcional de al menos un gen que codifica cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio especialmente útil para conseguir la perturbación funcional del conjunto de reacción es mediante la delección de cada gen de codificación. Sin embargo, en algunos casos, puede ser beneficioso perturbar la reacción mediante otras anomalías genéticas entre las que se incluyen, por ejemplo, mutación, delección de regiones reguladoras tales como promotores o sitios de unión a cis de los factores reguladores, o mediante truncamiento de la secuencia de codificación en cualquiera de numerosas ubicaciones. Estas últimas anomalías, que dan como resultado la delección completa del conjunto génico pueden ser útiles, por ejemplo, cuando se desea una evaluación rápida del acoplamiento del succinato o cuando es menos probable que ocurra la reversión génica.

Para identificar soluciones productivas adicionales para el problema OptKnock de dos niveles anteriormente descrito que proporcione conjuntos adicionales de reacciones a perturbar o modificaciones metabólicas que puedan dar como resultado una biosíntesis, incluyendo la biosíntesis de 4-HB u otro producto bioquímico acoplada al crecimiento, se puede implementar otro método de optimización, denominado de cortes enteros. Este método progresa resolviendo el problema OptKnock anteriormente ilustrado de forma iterativa con la incorporación de una restricción adicional que se denomina corte entero en cada iteración. La restricción de corte entero evita eficazmente que el procedimiento de resolución seleccione exactamente el mismo conjunto de reacciones identificado en cualquier iteración anterior que obligatoriamente acopla la biosíntesis del producto con el crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica acoplada con el crecimiento anteriormente identificada especifica que las reacciones

1, 2, y 3 se deber perturbar, entonces, la siguiente restricción impide las mismas reacciones se consideren simultáneamente en posteriores soluciones: $y_1 + y_2 + y_3 \geq 1$. El método de corte entero es bien conocido en la técnica y se puede encontrar descrito en, por ejemplo, la referencia, Burgard et al., *Biotechnol. Prog.*, 17: 791-797 (2001). Análogamente a todos los métodos descritos en el presente documento con referencia a su uso combinado con la infraestructura informática OptKnock para modelización y simulación metabólica, el método de corte entero para reducir la redundancia en el análisis informático iterativo también se puede aplicar a otras infraestructuras informáticas bien conocidas en la materia incluyendo, por ejemplo, SimPheny®.

Las restricciones del tipo anterior impiden la identificación de conjuntos de reacción más grandes que incluyen conjuntos ya identificados. Por ejemplo, el uso del método de optimización de corte entero anterior en una iteración posterior impediría la identificación de un cuádruple conjunto de reacciones que especifique que las reacciones 1, 2, y 3 se deben perturbar, ya que estas reacciones se han identificado con anterioridad. Para garantizar la identificación de todos los posibles conjuntos de reacciones que conducen a la producción biosintética de un producto, se puede utilizar una modificación del método de corte entero.

En resumen, el procedimiento de corte entero modificado comienza con la iteración 'cero' que calcula la producción máxima del producto bioquímico deseado para el crecimiento óptimo con una red natural. Este cálculo corresponde a una solución OptKnock con K igual a 0.

A continuación, se consideran desactivaciones simples y se introducen dos conjuntos de parámetros, $objstore_{iter}$ e $ystore_{iter,j}$, para guardar la función objetivo ($v_{químico}$) e información de activación-desactivación de la reacción (y_j), respectivamente, en cada iteración, $iter$. A continuación, las siguientes restricciones se añaden sucesivamente a la formulación OptKnock en cada iteración.

$$v_{químico} \geq objstore_{iter} + \varepsilon - M \cdot \sum_{j \in ystore_{iter,j}=0} y_j$$

En la ecuación anterior, ε y M son números pequeños y grandes, respectivamente. En general, ε se puede ajustar a aproximadamente 0,01 y M se puede ajustar a aproximadamente 1000. Sin embargo, también se pueden utilizar números más grandes y/o más pequeños que los citados. M garantiza que la restricción solamente puede ser vinculante para estrategias de desactivación anteriormente identificadas, mientras que ε garantiza que la adición de desactivaciones a una estrategia previamente identificada debe llevar a un aumento de al menos ε en la producción bioquímica durante el crecimiento óptimo. Esta estrategia pasa a delecciones dobles cuando una estrategia de delección única no consigue mejorar la cepa natural. Después se consideran las delecciones triples cuando ninguna estrategia de delección doble mejora la cepa natural, y así sucesivamente. El resultado final es una lista ordenada, representada por la producción bioquímica deseada en el crecimiento óptimo, de diferentes estrategias de delección que se diferencian entre sí como mínimo en una inactivación. Este procedimiento de optimización, así como la identificación de una amplia variedad de conjuntos de reacciones que, cuando se perturban, conducen a la biosíntesis, incluyendo la producción acoplada con el crecimiento, de un producto bioquímico. Con las enseñanzas y directrices que se proporcionan en el presente documento, los expertos en la materia entenderán que los métodos y diseños de la ingeniería metabólica ilustrada en el presente documento se pueden aplicar análogamente para identificar nuevas rutas biosintéticas y/o al acoplamiento obligatorio entre el crecimiento de la célula o el microorganismo y cualquier producto bioquímico.

Los métodos anteriormente ilustrados e ilustrados adicionalmente en los Ejemplos siguientes permiten la construcción de las células y organismos que producen de forma biosintética, incluyendo el acoplamiento obligado entre la producción de un producto bioquímico deseado y el crecimiento de la célula u organismo diseñados para contener las alteraciones genéticas deseadas. En este sentido, se han identificado alteraciones genéticas 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 los microorganismos sin modificar. Estas cepas se pueden utilizar provechosamente para la producción comercial de 4-HB, BDO, THF y GBL, por ejemplo, en un proceso de fermentación continuo sin estar sometidas a presiones de selección negativa.

Por tanto, los métodos informáticos descritos en el presente documento permiten la identificación e implementación de modificaciones metabólicas que se identifican mediante un método in silico seleccionado para OptKnock o SimPheny. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir, por ejemplo, la adición de una o más rutas enzimáticas biosintéticas y/o la perturbación funcional de una o más reacciones metabólicas entre las que se incluyen, por ejemplo, la perturbación por delección del gen.

La aplicación del método OptKnock para identificar rutas adecuadas para la producción del 1,4-butanodiol (BDO) acoplada al crecimiento se describe en los Ejemplos V-VII. Tal como se ha descrito anteriormente, la metodología OptKnock se desarrolló sobre la base de que las redes microbianas mutantes pueden evolucionar hacia sus fenotipos de crecimiento máximo previstos por el modelo cuando se someten a periodos prolongados de selección por crecimiento. En otras palabras, la estrategia aprovecha la capacidad del organismo para autooptimizarse bajo presión selectiva. La infraestructura OptKnock permite la enumeración exhaustiva de combinaciones de deleciones de genes que fuerzan un acoplamiento entre la producción bioquímica y el crecimiento de la célula en función de la estequiometría de la red. La identificación de desactivaciones de genes/reacciones óptimas requiere la resolución de un problema de optimización de dos niveles que selecciona el conjunto de reacciones activas de tal forma que una solución de crecimiento óptimo de la red resultante produce un exceso del producto bioquímico de interés (Burgard et al. Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)).

La producción bioquímica acoplada con el crecimiento se puede visualizar en el contexto de los límites de producción bioquímica de una red metabólica típica. Estos límites se obtienen a partir de un modelo *in silico* fijando la tasa o tasas de recaptación del sustrato o sustratos limitantes a sus valores experimentalmente determinados, y calculando las tasas máximas y mínimas de producción bioquímica para cada nivel de crecimiento que se puede alcanzar. La producción implica básicamente todo lo que es posible abarcando todos los fenotipos biológicos potenciales disponibles para una cepa dada. Aunque se producen excepciones, típicamente, la producción de un producto bioquímico deseado está en competencia directa con la formación de recursos intracelulares (véase la figura 5, región gris). Así, un rendimiento bioquímico mejorado necesariamente dará como resultado un crecimiento inferior al máximo. Adicionalmente, la aplicación de presiones de selección por crecimiento puede impulsar el rendimiento de producción no acoplada al crecimiento de una cepa hacia un genotipo de baja producción (punto A, figura 5), independientemente de su punto de partida inicial. La desactivación sugerida por OptKnock está diseñada para restringir el límite admisible de la solución, forzando un cambio en el comportamiento metabólico como se representa en la figura 5 (región cian). La estrategia de la ingeniería de evolución se puede aplicar para impulsar el rendimiento de una cepa diseñada mediante OptKnock hacia el límite situado más a la derecha. Esto dará como resultado una cepa de producción elevada que debería ser intrínsecamente estable para presiones de selección por crecimiento adicionales (punto B, figura 5).

Se usó un modelo estequiométrico *in silico* del metabolismo de *E. coli* para identificar los genes esenciales de las rutas metabólicas, como se ha ilustrado y descrito anteriormente en, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y en la patente de Estados Unidos. n° 7.127.379. Como se divulga en el presente documento, la infraestructura matemática OptKnock se aplicó para detectar deleciones de genes que conducían a una producción de BDO acoplada al crecimiento (véanse los Ejemplos V-VII). Se determinaron inicialmente estrategias mediante un modelo reducido de la red metabólica de *E. coli*. Este modelo "pequeño" incluye las funcionalidades metabólicas clave de la red, eliminando de esta forma la redundancia asociada con las redes metabólicas a escala genómica. Se prestó atención a garantizar que el modelo no se había reducido hasta el punto de no incluir rutas potencialmente activas que tenían dianas viables. En su conjunto, el modelo reducido contenía 262 reacciones y su implementación redujo el tiempo de CPU de OptKnock CPU en aproximadamente diez veces en comparación con la aplicación de OptKnock al modelo a escala genómica de *E. coli* (Reed et al., Genome Biol. 4:R54 (2003)).

Además, la solución del problema OptKnock de dos niveles proporciona solamente un conjunto de deleciones. Para enumerar todas las soluciones significativas, es decir, todos los conjuntos de desactivaciones que conducen a una formación de la producción acoplada al crecimiento, se puede implementar una técnica de optimización denominada de cortes enteros. Esto conlleva resolver el problema OptKnock de forma iterativa con la incorporación de una restricción adicional que se denomina corte entero en cada iteración, tal como se ha descrito anteriormente.

Para las rutas bioquímicas que conducen al 1,4-butanodiol, se espera que la conversión de glucosa en BDO en *E. coli* derive de un total de tres etapas de reducción intracelular a partir del semialdehído succínico (véase la figura 6). *E. coli* produce de forma natural el semialdehído succínico mediante el ciclo intermedio TCA, alfa-cetoglutarato, mediante la acción de dos enzimas, la glutamato:semialdehído succínico transaminasa y glutamato descarboxilasa. Una ruta alternativa, utilizada por el anaerobio estricto *Clostridium kluyveri* para degradar el succinato, activa el succinato a succinil-CoA, y posteriormente convierte el succinil-CoA en semialdehído succínico usando una semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA (Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993)). La conversión de succinato semialdehído en BDO requiere en primer lugar la actividad de la 4-hidroxibutanoato (4-HB) deshidrogenasa, un enzima no natural para *E. coli* o levaduras, pero que se encuentra en diversas bacterias tales como *C. kluyveri* y *Ralstonia eutropha* (Lutke-Eversloh y Steinbuechel, FEMS Microbiol. Lett. 181:63-71 (1999); 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)). El precedente de la conversión de 4-HB en BDO se ha demostrado en el anaerobio estricto, *Clostridium acetobutylicum*, que cuando se alimentó con 4-HB, demostró producir cuantitativamente BDO (Jewell et al., Current Microbiology 13:215-219 (1986)). Las biotransformaciones necesarias de 4-HB a BDO se suponen similares a las de la conversión de ácido butírico en butanol habitual de las especies de *Clostridia*, que transcurre mediante un derivado de CoA (Girbal et al., FEMS Microbiology Reviews 17:287-297 (1995)).

Además, se describe un microorganismo no natural que comprende una o más perturbaciones génicas, las una o más perturbaciones génicas se producen en genes que codifican un enzima obligatorio para acoplar la producción de 1,4-butanodiol al crecimiento del microorganismo cuando la perturbación del gen reduce la actividad de un

enzima, en donde la una o más perturbaciones génicas transmiten una producción estable acoplada al crecimiento de 1,4-butanodiol en el microorganismo no natural. La una o más perturbaciones génicas pueden ser, por ejemplo, las descritas en la Tabla 6 o 7. La una o más perturbaciones génicas pueden comprender perturbaciones que comprenden una delección del uno o más genes, tales como los genes divulgados en la Tabla 6 ó 7.

Como se divulga en el presente documento, el microorganismo no natural puede ser una bacteria, levadura u hongo. Por ejemplo, el microorganismo no natural puede ser una bacteria tal como *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Rhizobium etli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces coelicolor*, *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Pseudomonas putida*. El microorganismo no natural también puede ser una levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, y *Pichia pastoris*.

Un microorganismo no natural de la divulgación puede comprender un conjunto de modificaciones metabólicas que acoplan obligatoriamente la producción de 1,4-butanodiol al crecimiento del microorganismo, comprendiendo el conjunto de modificaciones metabólicas la perturbación de uno o más genes seleccionados entre el conjunto de genes que comprenden *adhE*, *ldhA*, *pflAB*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *mgo*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *aspA*; *adhE*, *mdh*, *ldhA*, *pflAB*, *sfcA*; *adhE*, *mdh*, *ldhA*, *pflAB*, *maeB*; *adhE*, *mdh*, *ldhA*, *pflAB*, *sfcA*, *maeB*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *pntAB*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *gdhA*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE*, *ycdW*; y *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE*, *ycdW*, *prpC*, *gsk*, o un ortólogo del mismo, en el que el microorganismo muestra una producción de 1,4-butanodiol acoplada al crecimiento estable.

En un aspecto, se divulga un microorganismo no natural que comprende un conjunto de modificaciones metabólicas obligadas para acoplar la producción de 1,4-butanodiol al crecimiento del microorganismo, comprendiendo el conjunto de modificaciones metabólicas la perturbación de uno o más genes, o un ortólogo del mismo, en el que el conjunto de modificaciones metabólicas comprende la perturbación de *adhE* y *ldhA*, en el que el microorganismo muestra una producción de 1,4-butanodiol acoplada al crecimiento estable. En un aspecto adicional, el conjunto de modificaciones metabólicas puede comprender además la perturbación de *mdh*. En otro aspecto, el conjunto de modificaciones metabólicas puede comprender además la perturbación de uno o más genes seleccionados entre el conjunto de genes que comprenden *mgo*, *aspA*, *sfcA*, *maeB*, *pntAB*, y *gdhA* y puede incluir, por ejemplo, la perturbación de *sfcA* y *maeB*. En otro aspecto más, el conjunto de modificaciones metabólicas puede comprender además la perturbación de uno o más genes seleccionados entre el conjunto de genes que comprenden *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE*, *ycdW*, *prpC*, y *gsk*, incluyendo la perturbación de todos los *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE* y *ycdW*, y puede comprender además la perturbación de *prpC* y *gsk*. Cualquiera de los conjuntos de modificaciones metabólicas anteriormente descritas puede comprender además la perturbación de *pflAB*. En un aspecto particular, el conjunto de modificaciones metabólicas comprende la perturbación de uno o más genes seleccionados entre el conjunto de genes que comprenden *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, y *aspA*, incluyendo hasta la totalidad de los genes *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, y *aspA*.

Un microorganismo no natural descrito puede comprender además una ruta biosintética 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica la 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 cantidad suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO), como se divulga en el presente documento.

Se proporciona adicionalmente un método para producir un microorganismo no natural que tiene una producción de 1,4-butanodiol acoplada al crecimiento estable identificando in silico un conjunto de modificaciones metabólicas que requieren la producción de 1,4-butanodiol durante el crecimiento exponencial bajo un conjunto definido de condiciones, y modificar genéticamente un microorganismo para que contenga el conjunto de modificaciones metabólicas que requieren la producción de 1,4-butanodiol. Dichos métodos pueden incluir adicionalmente la adición de genes exógenos que expresan las actividades enzimáticas deseadas en un microorganismo. Dicho conjunto de modificaciones metabólicas se puede identificar por un método in silico seleccionado entre OptKnock o SimPheny (véase anteriormente y los Ejemplos V-VII).

La divulgación describe adicionalmente un microorganismo producido con los métodos divulgados en el presente documento. Adicionalmente, se divulga un método para producir 1,4-butanodiol acoplado al crecimiento de un microorganismo. El método puede incluir las etapas de cultivar en la fase de crecimiento exponencial, en cantidad suficiente de nutrientes y medio, un microorganismo no natural que comprende un conjunto de modificaciones metabólicas que acoplan obligatoriamente la producción de 1,4-butanodiol al crecimiento del microorganismo, en el que el microorganismo muestra una producción de 1,4-butanodiol acoplada al crecimiento estable, y aislar el 1,4-butanodiol producido a partir del microorganismo no natural. El conjunto de modificaciones metabólicas que comprende la perturbación de uno o más genes se puede seleccionar entre el conjunto de genes que comprenden *adhE*, *ldhA*, *pflAB*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *mgo*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *aspA*; *adhE*, *mdh*, *ldhA*, *pflAB*, *sfcA*; *adhE*, *mdh*, *ldhA*, *pflAB*, *maeB*; *adhE*, *mdh*, *ldhA*, *pflAB*, *sfcA*, *maeB*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *pntAB*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *gdhA*; *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE*, *ycdW*; y *adhE*, *ldhA*, *pflAB*, *mdh*, *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE*, *ycdW*, *prpC*, *gsk*, o un ortólogo del mismo.

En un aspecto, se describe un método para producir 1,4-butanodiol acoplado al crecimiento de un microorganismo. El método puede incluir las etapas de cultivar en la fase de crecimiento exponencial, en cantidad suficiente de nutrientes y medio, un microorganismo no natural que comprende un conjunto de modificaciones metabólicas que acoplan obligatoriamente la producción de 1,4-butanodiol al crecimiento del microorganismo, comprendiendo el conjunto de modificaciones metabólicas la perturbación de uno o más genes, o un ortólogo del mismo, en el que el conjunto de modificaciones metabólicas comprende la perturbación de *adhE* y *ldhA*, en el que el microorganismo muestra una producción de 1,4-butanodiol acoplada al crecimiento estable; y aislar el 1,4-butanodiol producido a partir del microorganismo no natural. En un aspecto adicional, el conjunto de modificaciones metabólicas puede comprender además la perturbación de *mdh*. En otro aspecto, el conjunto de modificaciones metabólicas puede comprender además la perturbación de uno o más genes seleccionados entre el conjunto de genes que comprenden *mqo*, *aspA*, *sfcA*, *maeB*, *pntAB*, y *gdhA* y puede incluir, por ejemplo, la perturbación de *sfcA* y *maeB*. En otro aspecto más, el conjunto de modificaciones metabólicas puede comprender además la perturbación de uno o más genes seleccionados entre el conjunto de genes que comprenden *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *viaE*, *ycdW*, *prpC*, y *gsk*, incluyendo la perturbación de todos los *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *viaE* y *ycdW*, y puede comprender además la perturbación de *prpC* y *gsk*. Cualquiera de los conjuntos de modificaciones metabólicas anteriormente descritas puede comprender además la perturbación de *pflAB*.

En un método para producir BDO, el microorganismo no natural puede comprender además una ruta biosintética 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica la 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, 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 cantidad suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO).

EJEMPLO I

Biosíntesis del ácido 4-hidroxibutanoico

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

Los informes anteriores sobre la síntesis de 4-HB en microbios se han centrado en este compuesto como un compuesto intermedio en la producción del plástico biodegradable poli-hidroxialcanoato (PHA) (patente de Estados Unidos nº 6.117.658). El uso de copolímeros 4-HB/3-HB puede ser ventajoso comparado con el polímero de poli-3-hidroxibutirato (PHB) más habitual porque el plástico resultante es menos quebradizo (Saito y Doi, *Intl. J. Biol. Macromol.* 16:99-104 (1994)). La producción del 4-HB monomérico descrito en el presente documento es fundamentalmente un proceso diferente por varios motivos: 1). El producto se secreta, a diferencia del PHA, que se produce intracelularmente, y permanece en la célula; 2) para los organismos que producen polímeros de hidroxibutanoato, no se produce 4-HB libre, sino en su lugar el derivado de Coenzima A, que utiliza la poli-hidroxialcanoato sintasa; 3) en el caso del polímero, la formación de productos granulares altera la termodinámica; y 4) el pH extracelular no es un problema para la producción del polímero, mientras que resultará alterado si 4-HB está presente en forma de ácido libre o como base conjugada, y también el equilibrio entre 4-HB y GBL.

4-HB se puede producir por dos etapas de reducción desde succinato, un metabolito central del ciclo TCA, con el semialdehído succínico como el compuesto intermedio (figura 2). La primera de estas enzimas, la semialdehído succínico deshidrogenasa, es natural para muchos organismos incluyendo *E. coli*, en el que se han encontrado las dos enzimas dependientes de NADH y 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)). Existe también evidencia que respalda la actividad de la semialdehído succínico deshidrogenasa en *S. cerevisiae* (Ramos et al., *Eur. J. Biochem.* 149:401-404 (1985)), y se ha identificado un posible gen por homología de secuencia. Sin embargo, la mayoría de los informes indican que esta enzima progresa en la dirección de la síntesis de succinato, en oposición a lo que se muestra en la figura 2 (Donnelly y Cooper, más arriba; Lutke-Eversloh y Steinbuchel, *FEMS Microbiol. Lett.* 181:63-71 (1999)), participando en la ruta degradativa de 4-HB y gamma-aminobutirato. Una ruta alternativa, utilizada por el anaerobio estricto *Clostridium kluyveri* para degradar el succinato, activa el succinato a succinil-CoA, y posteriormente convierte el succinil-CoA en semialdehído succínico usando una semialdehído succínico deshidrogenasa alternativa que se sabe que actúa en esta dirección (Sohling y Gottschalk, *Eur. J. Biochem.* 212:121-127 (1993)). Sin embargo, esta ruta tiene el coste energético del ATP necesario para convertir el succinato a succinil-CoA.

La segunda enzima de la ruta, 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, no es natural para *E. coli* o levaduras, pero que se encuentra en diversas bacterias tales como *C. kluyveri* y *Ralstonia eutropha* (Lutke-Eversloh y Steinbuchel, más arriba; 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, con lo que se supone que pueden existir formas dependientes de NADPH. Una ruta adicional hacia 4-HB desde alfa-cetoglutarato se ha demostrado en *E. coli* dando como resultado la acumulación de poli(ácido 4-hidroxibutírico) (Song et al., *Wei Sheng Wu Xue. Bao.* 45:382-386 (2005)). La cepa recombinante necesita la sobreexpresión de tres genes heterólogos, PHA sintasa (*R. eutropha*), 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (*R. eutropha*) y 4-hidroxibutirato:CoA transferasa (*C. kluyveri*), junto con dos genes naturales de *E. coli*: glutamato:semialdehído succínico transaminasa y glutamato descarboxilasa. Las etapas 4 y 5 de 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 aún no se ha aplicado para alterar la producción de 4-HB o polímeros relacionados en ningún organismo.

La direccionalidad notificada de la 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 del succinato o succinil-CoA en 4-HB eran termodinámicamente favorables, o no lo eran, (es decir, $\Delta G_r < 0$) en las típicas condiciones fisiológicas presentes en *E. coli* y *S. cerevisiae*. Se supone que todas las reacciones de oxidación/reducción utilizan NADH, aunque los resultados para la supuesta utilización de NADPH serían similares. Se calcularon las energías libres de Gibbs estándar de formación (ΔG_f°) para cada compuesto de la figura 2 basándose en el método de contribución de grupos (Mavrovouniotis, M. L., *J. Biol. Chem.* 266:14440-14445 (1991)). Cada energía de Gibbs estándar de formación se transformó a continuación para obtener un criterio de cambio espontáneo a la presión, temperatura, pH y fuerza iónica especificados (Alberty, R. A., *Biochem. Biophys. Acta* 1207:1-11 (1994)) (ecuación 1).

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

Donde ΔG_f° es la energía de Gibbs estándar de formación, N_H es el número de átomos de hidrógeno en el compuesto, R es la constante universal de los gases, 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 tienen un papel para determinar la factibilidad termodinámica. Normalmente, el pH intracelular de las células está muy bien regulado, incluso cuando hay grandes variaciones en el pH del cultivo. El pH intracelular de *E. coli* y *S. cerevisiae* se han notificado en la bibliografía. *E. coli* mantiene un pH intracelular de 7,4-7,7 durante las condiciones de crecimiento típicas en tampones neutros, pero puede disminuir a 7,2 en un medio a pH 6, e incluso bajar hasta 6,9 para un pH externo de 5 (Riondet et al., *Biotechnology Tech.* 11:735-738 (1997)). Sin embargo, el crecimiento de *E. coli* queda fuertemente inhibido a un pH externo inferior a 6. El pH de las levaduras muestra una variación mayor. Durante la fase de crecimiento exponencial, el pH interno de *S. cerevisiae* se ha medido en el intervalo de 6,7-7,0 para un pH externo controlado a 5,0 (Dombek e Ingram, *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1286-1291 (1987)). Por otra parte, en células en reposo, el pH interno baja por debajo de 6 cuando el pH externo es 6 o inferior (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 supone una fuerza iónica de 0,15 (Valenti et al., más arriba).

Las energías de Gibbs de formación transformadas se calcularon en el estado estándar (pH=7,0, I=0) y para los estados fisiológicos de *E. coli* (pH=7,4, I=0,15) y *S. cerevisiae* (pH=6,8, I=0,15). Las energías de Gibbs de reacción (ΔG_r) transformadas se calcularon a continuación calculando la diferencia de ΔG_f entre productos y reactivos. Las energías de Gibbs de las reacciones transformadas necesarias para convertir succinato o succinil-CoA en 4-HB se proporcionan en la Tabla 2. A resaltar que el error estándar, $U_{f,est}$, para la ΔG_f calculada mediante la teoría de contribución de grupos es de 4 kcal/mol. Esta incertidumbre sobre el valor de ΔG_r , $U_{r,est}$, se puede calcular como la norma euclídea de la incertidumbre de ΔG_f para cada compuesto (ecuación).

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

Donde n es el coeficiente estequiométrico e i es el compuesto. Para las reacciones examinadas, esta incertidumbre es de aproximadamente 8 kcal/mol.

Tabla 2. Energía libre de Gibbs de reacción (kcal/mol) para diferentes valores de pH y fuerza iónica. La primera columna está en condiciones estándar, mientras que las demás se han ajustado de acuerdo con la ecuación 1. La temperatura es constante a 298 K. Las barras de error de estos valores son de aproximadamente 8 kcal/mol, calculado mediante la ecuación 2. Abreviaturas: suc, succinato; sucса, semialdehído succínico; succoa, succinil-CoA; Pi, fosfato inorgánico.

Reacción	ΔG_f° pH = 7,0 IS = 0	$\Delta G_f'$ pH = 7,4 IS = 0,15 M	$\Delta G_f'$ pH = 6,8 IS = 0,15 M
succ + NADH + 2 H ⁺ → sucса + NAD + h ₂ O	12,0	14,4	12,8
succ + coa + ATP → succoa + ADP + Pi	0,30	-0,03	-0,03
succoa + NADH + H ⁺ → sucса + NAD + coa	4,4	7,0	6,2
sucса + NADH + H ⁺ → 4hb + NAD	-5,0	-3,8	-4,6

Después de considerar la posible incertidumbre en los cálculos de los inventores, la Tabla 2 revela que es más probable que la reacción de la semialdehído succínico deshidrogenasa (etapa 1 de la figura 2) encuentre una

barrera termodinámica. También se estudió si esta reacción se puede acercar a la factibilidad termodinámica variando las concentraciones supuestas de los metabolitos participantes. Por ejemplo, las energías de Gibbs estándar suponen concentraciones de 1 M para todos los compuestos participantes (excepto el agua). En un entorno anaerobio, NADH estará presente en una concentración varias veces superior a la de NAD. Suponiendo [NADH]=5×[NAD], los inventores calcularon el efecto sobre $\Delta G'_i$ usando la ecuación

$$\Delta G'_f = \Delta G_f^0 + RT \ln \frac{\prod [prod]}{\prod [react]} \quad (3)$$

Este cambio dio como resultado una diferencia de solo aproximadamente 1 kcal/mol en los valores de delta G para la semialdehído succínico deshidrogenasa. También se utilizó la ecuación 3 para calcular otros efectos sobre ΔG_i , tales como una concentración de succinato elevada para impulsar las reacciones. Una diferencia de 1000 veces en las concentraciones de succinato y semialdehído succínico contribuyó a aproximadamente 5 kcal/mol a delta G. Tomado conjuntamente con una incertidumbre supuesta de 8 kcal/mol, la posibilidad de que la semialdehído succínico deshidrogenasa actúe en la dirección del semialdehído succínico en algún conjunto de condiciones fisiológicas no se puede eliminar. Así, los autores siguen considerando la ruta directa desde succinato hasta 4-HB en su análisis teórico posterior.

Se analizaron en dos microbios las capacidades de producción microbiana de 4-hidroxibutirato, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, usando los modelos metabólicos in silico de cada organismo. Las rutas potenciales para dar 4-HB progresan mediante un compuesto de succinato, succinil-CoA, o alfa-cetoglutarato como se muestra en la figura 2.

La primera etapa en la ruta de producción de 4-HB desde succinato implica la conversión de succinato en semialdehído succínico mediante un semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de NADH o NADPH. En *E. coli*, gabD es una semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de NADP que forma parte de una agrupación de genes implicada en la captación y degradación del 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 el enzima para la actividad de la semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de NAD (Marek and Henson, más arriba). *S. cerevisiae* contiene solamente la semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de NADPH, teóricamente asignada a UGA2, que se encuentra en el citosol (Huh et al., *Nature* 425:686-691 (2003)). Los cálculos del rendimiento máximo suponiendo la ruta del succinato para dar 4-HB tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* requiere solamente la asunción de que se ha añadido una 4-HB deshidrogenasa no natural a sus redes metabólicas.

La ruta desde succinil-CoA hasta 4-hidroxibutirato se describe en la patente de Estados Unidos nº 6.117.658 como parte de un proceso para fabricar polihidroxialcanoatos que comprenden unidades monoméricas de 4-hidroxibutirato. *Clostridium kluyveri* es un ejemplo de organismo conocido que tiene actividad semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA (Sohling y Gottschalk, más arriba; Sohling y Gottschalk, más arriba). En este estudio, se supone que dicha enzima, derivada de *C. kluyveri* u otro organismo, se expresa en *E. coli* o *S. cerevisiae* junto con una 4-HB deshidrogenasa no natural o heteróloga para completar la ruta desde succinil-CoA hasta 4-HB. La ruta desde alfa-cetoglutarato hasta 4-HB se ha demostrado en *E. coli* dando como resultado la acumulación de poli(ácido 4-hidroxibutírico) hasta un 30% del peso celular seco (Song et al., más arriba). Como *E. coli* y *S. cerevisiae* tienen de forma natural o endógena glutamato:semialdehído succínico transaminasa y glutamato descarboxilasa (Coleman et al., *J. Biol. Chem.* 276:244-250 (2001)), la ruta desde AKG hasta 4-HB se puede completar en ambos organismos suponiendo solamente que está presente una 4-HB deshidrogenasa no natural.

EJEMPLO II

Producción de ácido 4-hidroxibutanoico en *E. coli*

Este Ejemplo describe los rendimientos biosintéticos del ácido 4-hidroxibutanoico resultantes de cada ruta bioquímica.

En esta sección, se calcularon los rendimientos teóricos máximos de 4-HB procedente de glucosa suponiendo que cada una de las tres rutas metabólicas representadas gráficamente en la figura 2 son funcionales en *E. coli*. Un modelo metabólico a escala genómica de *E. coli*, similar al descrito en Reed et al., *Genome Biol.* 4:R54 (2003), se usó como base para el análisis. Se calculó la ganancia energética, en términos de moléculas de ATP producidas, de cada ruta de rendimiento máximo suponiendo condiciones anaerobias, salvo que se indique otra cosa. Se supone que el 4-hidroxibutirato sale de *E. coli* mediante el mecanismo de cotransporte paralelo de protones, como es el caso de la mayoría de los ácidos orgánicos. Es también posible que GBL se secrete por difusión simple, y, en este caso, el rendimiento energético sería más favorable que en el caso considerado aquí. También se investigó el impacto de la especificidad del cofactor (es decir, la dependencia de NADH o NADPH) de los enzimas participantes sobre el rendimiento máximo y el rendimiento energético de cada ruta.

En las Tablas 3 A-C se muestran los resultados del análisis. Desde un punto de vista energético y de rendimiento, la ruta del succinato a 4-HB es la más prometedora con la condición que se puedan superar las preocupaciones termodinámicas planteadas en el Ejemplo I. Específicamente, los cálculos revelan que el rendimiento máximo teórico de 4-HB a partir de glucosa es de 1,33 mol/mol (0,77 g/g; 0,89 moles C/moles C) suponiendo que la ruta de 4-HB a

succinato es funcional. Además, la producción anaerobia de 4-HB mediante succinato daría como resultado una producción neta de 1,8, 1,5, o 1,1 mol de ATP por glucosa dependiendo de la especificidad del cofactor supuesta de los enzimas participantes. Estos rendimientos energéticos son comparables con los 2,0 ATP por glucosa que se pueden obtener mediante fosforilación del sustrato debido a la producción de etanol o lactato sugiriendo el potencial de la producción anaerobia de homo-4-HB en *E. coli*.

La ruta de la succinil-CoA de 4-HB es la segunda ruta más prometedora cuando se considera el rendimiento máximo y el rendimiento energético. Se puede conseguir en *E. coli* un rendimiento de 1,33 mol/mol de 4-HB si al menos una de las etapas de la ruta se supone dependiente de NADH. Sin embargo, como esta ruta requiere la formación de succinil-CoA, su rendimiento energético es considerablemente menor que el de la ruta del succinato. Se anticipa un requerimiento de oxígeno a altos rendimientos de 4-HB si se supone que las etapas de la semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y de la 4-HB deshidrogenasa dependen de NADPH. En este caso, la producción de 4-HB en el rendimiento máximo no daría como resultado una ganancia neta de ATP y no podría soportar las demandas de mantenimiento energético necesarias para la supervivencia de *E. coli*. Por tanto, se podría originar algo de energía de la fosforilación oxidativa para permitir la producción homofermentativa de 4-HB. La ruta del alfa-cetoglutarato hacia 4-HB es la menos favorable de las tres rutas potenciales con un rendimiento máximo conseguible de 1,0 mol de 4-HB por mol de glucosa. Además del rendimiento máximo menor, esta ruta requiere la utilización de 1,5 moles de oxígeno por mol de glucosa convertido en 4-HB. El rendimiento energético de esta ruta no se ve afectado por la supuesta especificidad del cofactor de la 4-HB deshidrogenasa.

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

A) Ruta del succinato

Especificidad del 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	1,800	1,510	1,097

B) Ruta de la succinil-CoA

Especificidad del 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
CO ₂	0,667	0,667	0,698	0,082
H ₂ O	0,667	0,667	0,698	0,470
ATP	0,467	0,177	0,000	0,000

C) Ruta del alfa-cetoglutarato

Especificidad del cofactor	1 etapas 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
CO ₂	2,000	2,000
H ₂ O	2,000	2,000
ATP	5,500	5,500

A fin de corroborar las predicciones de cálculo propuestas en este informe, las cepas que expresan una ruta completa hacia 4-HB se pueden construir y someter a ensayo. La corroboración se lleva a cabo con *E. coli* (Ejemplo II) y *S. cerevisiae* (Ejemplo III). En *E. coli*, los genes relevantes se expresan en un operón sintético tras un promotor inducible en un plásmido con un número de copias medio o alto; por ejemplo, el promotor PBAD que se induce por arabinosa, en un plásmido de la serie pBAD (Guzman et al., *J. Bacteriol.* 177:4121-4130 (1995)). En *S. cerevisiae*, los genes se integran en el cromosoma tras del promotor PDC1, sustituyendo el gen natural de la piruvato carboxilasa. Se ha notificado que esto da como resultado una mayor expresión de los genes extraños que desde un plásmido (Ishida et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1964-1970 (2005)), y garantizarán también la expresión durante las condiciones anaerobias.

Las células que contienen construcciones relevantes se hacen crecer en medios mínimos que contienen glucosa, con adición de arabinosa en el caso de *E. coli* que contiene genes expresados con el promotor PBAD. Se toman muestras periódicas para evaluar la expresión génica y un análisis de actividad enzimática. Se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática en extractos de células brutas utilizando procedimientos bien conocidos en la materia. Como alternativa, se pueden utilizar ensayos basados en la oxidación de NAD(P)H, que se producen en todas las etapas de reacción de las deshidrogenasas y se pueden detectar mediante espectrofotometría. Además, se pueden usar anticuerpos para detectar el nivel de enzimas concretas. En lugar de, o además de, medidas de actividad enzimática, se puede aislar el ARN de muestras paralelas y el transcripto del gen de interés se puede medir mediante PCR con transcriptasa inversa. Cualesquiera de las construcciones que carecían de expresión del transcripto detectable se volvieron a analizar para asegurar que los ácidos nucleicos codificables se habían incorporado en una forma expresable. Cuando se detectan los transcriptos, este resultado indica cualquiera de una carencia de traducción o la producción de un enzima inactiva. Se puede emplear adicionalmente una variedad de métodos bien conocidos en la técnica, tales como la optimización de codones, la genomaniplulación de un sitio de unión a ribosoma fuerte, el uso de un gen procedente de una especie diferente, y la prevención de la N-glicosilación (para la expresión de enzimas bacterianas en levadura) mediante conversión de restos Asn en Asp. Una vez que se detectaron todas las actividades enzimáticas requeridas, la siguiente etapa es medir la producción de 4-HB in vivo. Se hacen crecer cultivos en matraces de cultivo por triplicado tanto anaerobia como microaeróbicamente, dependiendo de las condiciones requeridas (véase anteriormente), y se toman muestras periódicas. Los ácidos orgánicos presentes en los sobrenadantes del cultivo se analizaron mediante HPLC utilizando la columna Aminex AH-87X. El tiempo de elución de 4-HB se determinará usando un patrón adquirido de un proveedor de sustancias químicas.

Se puede implementar la ruta independiente de CoA y someterse a ensayo para corroboración. En este caso, los genes expresados en exceso son los de la semialdehído succínico deshidrogenasa natural de cada organismo, y de la 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha*. Una vez detectadas las actividades enzimáticas como se ha descrito anteriormente, las cepas se someten a ensayo para determinar la producción de 4-HB. Se puede obtener también la corroboración implementando la ruta dependiente de CoA. La semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y la 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa procedente de *Clostridium kluyveri* se expresan como se ha descrito anteriormente. Además, se puede llevar también a cabo la sobreexpresión de succinil-CoA sintetasa natural, para canalizar más succinato hacia la ruta heteróloga. Finalmente, si la producción de 4-HB es desfavorable, se pueden probar diferentes condiciones de cultivo, tales como un cambio en el estado de la oxigenación que pueda manipular la proporción NAD(P)H/NAD(P).

EJEMPLO III

Producción de ácido 4-hidroxibutanoico en levaduras

- 5 Este Ejemplo describe los rendimientos biosintéticos del ácido 4-hidroxibutanoico resultantes de cada ruta bioquímica en *S. cerevisiae*.

En esta sección, se calcularon los rendimientos máximos teóricos de 4-HB a partir de glucosa suponiendo que cada una de estas tres rutas metabólicas representadas gráficamente en la figura 2 son funcionales en *S. cerevisiae*. Se usó como base del análisis un modelo metabólico a escala genómica de *S. cerevisiae*, similar al descrito en Forster et al. (Genome Res. 13:244-253 (2003)). Se calculó la ganancia energética de cada ruta de rendimiento máximo suponiendo condiciones anaerobias salvo que se indique lo contrario. Se supone que el 4-hidroxibutirato sale de *S. cerevisiae* mediante el mecanismo de cotransporte paralelo de protones, como es el caso de la mayoría de los ácidos orgánicos. También se investigó el impacto de la especificidad del cofactor (es decir, la dependencia de NADH o NADPH) de los enzimas participantes sobre el rendimiento máximo y el rendimiento energético de cada ruta.

En las Tablas 4 A-C se muestran los resultados del análisis. Análogamente a *E. coli*, la ruta del succinato a 4-HB es la más prometedora con la condición que se puedan superar las preocupaciones termodinámicas planteadas en el Ejemplo I. Los cálculos revelan que el rendimiento máximo teórico de 4-HB a partir de glucosa es de 1,33 mol/mol (0,77 g/g; 0,89 mol C/mol C) en *S. cerevisiae*. Además, la producción anaerobia de 4-HB mediante succinato daría como resultado una producción neta de 1,4, 1,1, o 0,5 mol de ATP por glucosa dependiendo de la especificidad del cofactor supuesto de los enzimas participantes.

La ruta de la succinil-CoA a 4-HB es la segunda ruta más favorable. Se puede conseguir un rendimiento máximo de 1,33 mol de 4-HB/mol de glucosa en *S. cerevisiae* sin tener en cuenta la especificidad del cofactor. Sin embargo, la generación de energía neta en el rendimiento máximo teórico es posible solo si se supone que las etapas de la semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y la 4-HB deshidrogenasa son dependientes de NADPH. Si alguna etapa es dependiente de NADPH, no se obtendrá ATP neto de la producción de 4-HB anaerobia y se requeriría una fuente de energía alternativa (por ejemplo, la fosforilación oxidativa) para soportar el crecimiento y el mantenimiento celular. La ruta del alfa-cetoglutarato hacia 4-HB es la menos favorable de las tres rutas potenciales en *S. cerevisiae* aunque el rendimiento máximo de 1,1-1,2 mol de 4-HB por mol de glucosa es ligeramente mayor que el que se encontró en *E. coli*. Sin embargo, esta ruta requiere una captación de oxígeno de 0,8-0,9 mol de oxígeno por mol de glucosa para convertirse en energéticamente neutra.

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

A) Ruta del succinato

Especificidad del 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 la succinil-CoA

Especificidad del 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	0,533	0,000	0,000

C) Ruta del alfa-cetoglutarato

Especificidad del 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
CO ₂	1,364	1,448
H ₂ O	1,364	1,448
ATP	0,000	0,000

EJEMPLO IV

Biosíntesis del ácido 4-hidroxibutanoico, γ -butirolactona y 1,4-butanodiol

Este Ejemplo describe la producción biosintética de ácido 4-hidroxibutanoico, γ -butirolactona y 1,4-butanodiol usando fermentación y otros bioprocesos.

Se describen a continuación los métodos para integrar de la etapa de fermentación de 4-HB en un proceso completo para la producción de GBL, 1,4-butanodiol (BDO) y tetrahidrofurano (THF) purificados. Como 4-HB y GBL están en equilibrio, el caldo de fermentación contendrá ambos compuestos. A un pH bajo, este equilibrio se desplaza para favorecer GBL. Por tanto, la fermentación puede funcionar a pH 7,5 o menos. Tras la retirada de la biomasa, la corriente de producto entra en una etapa de separación en la que se retira el GBL y la corriente restante enriquecida en 4-HB se recircula. Finalmente, GBL se destila para eliminar cualquier impureza. El proceso funciona en uno de tres modos: 1) fermentación de alimentación discontinua y separación discontinua; 2) fermentación de alimentación discontinua y separación continua; 3) fermentación continua y separación continua. En la figura 4 se muestran esquemáticamente los dos primeros de estos modos. Los procedimientos de fermentación integrada descritos a continuación se usan también para las células productoras de BDO de la divulgación para la biosíntesis de BDO y los productos de la familia de BDO posteriores.

Protocolo de fermentación para producir 4-HB/GBL (discontinua): El organismo de producción se hace crecer en un biorreactor de 10 l en el que se burbujea una mezcla de N₂/CO₂, utilizando 5 l de caldo que contiene 5 g/l de fosfato de potasio, 2,5 g/l de cloruro de amonio, 0,5 g/l de sulfato de manganeso, y 30 g/l de solución de maíz macerado, y una concentración inicial de glucosa de 20 g/l. A medida que las células crecen y utilizan la glucosa, se alimenta más glucosa al 70% al biorreactor a una tasa aproximadamente igual al consumo de glucosa en equilibrio. La temperatura del biorreactor se mantiene a 30 grados 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 entre 5 y 10 g/l. El pH no está controlado, y disminuirá normalmente a pH 3-6 al final del ciclo. Tras la finalización del periodo de cultivo, el contenido del fermentador se pasa a través de una unidad de separación celular (por ejemplo, una centrífuga) para eliminar las células y los desechos celulares, y el caldo de fermentación se transfiere a una unidad de separación del producto. El aislamiento de 4-HB y/o GBL tendría lugar mediante procedimientos de separación convencionales empleados en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como la extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de 4-HB/GBL. La solución resultante se somete a continuación a métodos de destilación convencionales para eliminar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar GBL (punto de ebullición 204-205° C) que se aísla como un líquido purificado.

Protocolo de fermentación para producir 4-HB/GBL (completamente continuo): El organismo de producción se hace crecer en primer lugar en modo discontinuo utilizando el equipo y la composición del medio descrito anteriormente, excepto que la concentración inicial de glucosa es de 30-50 g/l. Cuando la glucosa se agotó, se suministró de forma continua medio de alimentación de la misma composición a una velocidad de entre 0,5 l/h y 1 l/h, y el líquido se retiró a la misma velocidad. La concentración de 4-HB en el biorreactor sigue siendo constante a 30-40 g/l, y la densidad celular permanece constante entre 3-5 g/l. La temperatura se mantuvo a 30 grados C, y el pH se mantuvo a 4,5 utilizando NaOH y HCl controlado, según sea necesario. El biorreactor se hace funcionar de forma continua durante un mes, con muestras tomadas cada día para asegurar la consistencia de la concentración de 4-HB. En modo continuo, el contenido del fermentador se retiró constantemente a medida que se suministraba medio de alimentación nuevo. Se sometió a continuación la corriente de salida, que contenía células, medio, y productos de 4-HB y/o GBL, a procedimientos de separación de productos en continuo, con o sin retirada de células y desechos celulares, y tendría lugar mediante métodos convencionales de separación continua empleados en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como la extracción continua líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de 4-HB/GBL. La solución resultante se somete posteriormente a métodos de destilación continua convencionales para eliminar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar GBL (punto de ebullición 204-205° C) que se aísla como un líquido purificado.

Protocolo de reducción de GBL: Una vez que se aisló y purificó GBL tal como se ha descrito anteriormente, se sometió a continuación a protocolos de reducción tales como aquellos bien conocidos en la técnica (referencias citadas) para producir 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos. Los catalizadores de hidrogenación heterogéneos u homogéneos combinados con GBL bajo presión de hidrógeno son bien conocidos por

proporcionar los productos 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos. Es importante señalar que la mezcla de producto de 4-HB/GBL que se separó del caldo de fermentación, como se ha descrito 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. Los productos resultantes, 1,4-butanodiol y THF, se aislaron y purificaron a continuación mediante procedimientos bien conocidos en la materia.

Protocolo de fermentación e hidrogenación para producir BDO o THF directamente (discontinuo): Se hacen crecer las células en un biorreactor de 10 l en el que se burbujea una mezcla de N_2/CO_2 , utilizando 5 l de caldo que contiene 5 g/l de fosfato de potasio, 2,5 g/l de cloruro de amonio, 0,5 g/l de sulfato de magnesio, y 30 g/l de solución de maíz macerado, y una concentración inicial de glucosa de 20 g/l. A medida que las células crecen y utilizan la glucosa, se alimenta más glucosa al 70% al biorreactor a una tasa aproximadamente igual al consumo de glucosa en equilibrio. La temperatura del biorreactor se mantiene a 30 grados 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 entre 5 y 10 g/l. El pH no está controlado, y disminuirá normalmente a pH 3-6 al final del ciclo. Tras la finalización del periodo de cultivo, el contenido del fermentador se pasa a través de una unidad de separación celular (por ejemplo, una centrífuga) para eliminar las células y los desechos celulares, y el caldo de fermentación se transfiere a una unidad de reducción (por ejemplo, recipiente de hidrogenación), donde la mezcla de 4-HB/GBL se redujo directamente a cualquiera de 1,4-butanodiol o THF o una mezcla de los mismos. Tras finalizar el procedimiento de reducción, el contenido del reactor se transfiere a una unidad de separación del producto. El aislamiento de 1,4-butanodiol y/o THF tendría lugar mediante procedimientos de separación convencionales empleados en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como la extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de 1,4-butanodiol y/o THF. La solución resultante se sometió a continuación a métodos de destilación convencionales para eliminar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar 1,4-butanodiol y/o THF, que se aislaron como líquidos purificados.

Protocolo de fermentación e hidrogenación para producir BDO o THF directamente (completamente continuo): Las células se hacen crecer en primer lugar en modo discontinuo utilizando el equipo y la composición del medio descritos anteriormente, excepto que la concentración inicial de glucosa es de 30-50 g/l. Cuando la glucosa se agotó, se suministró de forma continua medio de alimentación de la misma composición a una velocidad de entre 0,5 l/h y 1 l/h, y el líquido se retiró a la misma velocidad. La concentración de 4-HB en el biorreactor sigue siendo constante a 30-40 g/l, y la densidad celular permanece constante entre 3-5 g/l. La temperatura se mantuvo a 30 grados C, y el pH se mantuvo a 4,5 utilizando NaOH y HCl concentrado, según sea necesario. El biorreactor se hace funcionar de forma continua durante un mes, con muestras tomadas cada día para asegurar la consistencia de la concentración de 4-HB. En modo continuo, el contenido del fermentador se retiró constantemente a medida que se suministraba medio de alimentación nuevo. La corriente de salida, que contenía células, medio, y productos de 4-HB y/o GBL, se pasó a continuación a través de una unidad de separación celular (por ejemplo, una centrífuga) para eliminar las células y los desechos celulares, y el caldo se fermentación se transfirió a una unidad de reducción continua (por ejemplo, recipiente de hidrogenación), donde la mezcla de 4-HB/GBL se redujo directamente a cualquiera de 1,4-butanodiol o THF o una mezcla de los mismos. Tras finalizar el procedimiento de reducción, el contenido del reactor se transfiere a una unidad de separación continua del producto. El aislamiento de 1,4-butanodiol y/o THF tendría lugar mediante procedimientos de separación continua convencionales empleados en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como la extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de 1,4-butanodiol y/o THF. La solución resultante se sometió a continuación a métodos de destilación continua convencionales para eliminar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar 1,4-butanodiol y/o THF, que se aislaron como líquidos purificados.

Protocolo de fermentación para producir BDO directamente (discontinuo): El organismo de producción se hace crecer en un biorreactor de 10 l en el que se burbujea una mezcla de N_2/CO_2 , utilizando 5 l de caldo que contiene 5 g/l de fosfato de potasio, 2,5 g/l de cloruro de amonio, 0,5 g/l de sulfato de magnesio, y 30 g/l de solución de maíz macerado, y una concentración inicial de glucosa de 20 g/l. A medida que las células crecen y utilizan la glucosa, se alimenta más glucosa al 70% al biorreactor a una tasa aproximadamente igual al consumo de glucosa en equilibrio. La temperatura del biorreactor se mantiene a 30 grados C. El crecimiento continúa durante aproximadamente 24 horas, hasta que BDO alcanza una concentración de entre 20-200 g/l, siendo la densidad celular generalmente entre 5 y 10 g/l. Tras la finalización del periodo de cultivo, el contenido del fermentador se pasa a través de una unidad de separación celular (por ejemplo, una centrífuga) para eliminar las células y los desechos celulares, y el caldo de fermentación se transfiere a una unidad de separación del producto. El aislamiento de BDO tendría lugar mediante procedimientos de separación convencionales empleados en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como la extracción líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de BDO. La solución resultante se somete a continuación a métodos de destilación convencionales para eliminar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar GBL (punto de ebullición 228-229° C) que se aísla como un líquido purificado.

Protocolo de fermentación para producir BDO directamente (completamente continuo): El organismo de producción se hace crecer en primer lugar en modo discontinuo utilizando el equipo y la composición del medio descrito anteriormente, excepto que la concentración inicial de glucosa es de 30-50 g/l. Cuando la glucosa se agotó, se suministró de forma continua medio de alimentación de la misma composición a una velocidad de entre 0,5 l/h y 1 l/h, y el líquido se retiró a la misma velocidad. La concentración de BDO en el biorreactor sigue siendo constante a

30-40 g/l, y la densidad celular permanece constante entre 3-5 g/l. La temperatura se mantuvo a 30 grados C, y el pH se mantuvo a 4,5 utilizando NaOH y HCl concentrado, según sea necesario. El biorreactor se hace funcionar de forma continua durante un mes, con muestras tomadas cada día para asegurar la consistencia de la concentración de BDO. En modo continuo, el contenido del fermentador se retiró constantemente a medida que se suministraba medio de alimentación nuevo. Se sometió a continuación la corriente de salida, que contenía células, medio, y el producto de BDO, a procedimientos de separación de productos en continuo, con o sin retirada de células y desechos celulares, y tendría lugar mediante métodos convencionales de separación continua empleados en la técnica para separar los productos orgánicos de soluciones acuosas diluidas, tales como la extracción continua líquido-líquido utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una solución orgánica de BDO. La solución resultante se somete posteriormente a métodos de destilación continua convencionales para eliminar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar BDO (punto de ebullición 228-229° C) que se aísla como un líquido purificado (pf 20° C).

EJEMPLO V

Estrategias de desactivación procedentes de modelos in silico para la producción de 1,4-butanodiol acoplada al crecimiento de *Escherichia coli*

Este ejemplo describe el diseño in silico de estrategias de desactivación para generar la producción de 1,4-butanodiol acoplada al crecimiento de *E. coli*.

La estrategia para generar la producción de BDO acoplada al crecimiento implica en primer lugar la demostración de una ruta funcional que posteriormente se optimiza mediante la evolución adaptiva e inserciones, delecciones, y sobreexpresiones dirigidas de genes. A continuación se describen más detalladamente estrategias de genomanipulación de cepas identificadas mediante OptKnock para generar la producción de BDO acoplada al crecimiento en cepas de *Escherichia coli*. Todas las implementaciones de OptKnock suponen que están disponibles las actividades de todas las enzimas reseñadas en la figura 6 para *E. coli* en todas las condiciones. Además, todas las etapas de reducción de esta ruta se suponen dependientes de NADH, aunque se espera que algunos de los diseños sean de aplicación independientemente de la especificidad del cofactor.

El rendimiento potencial de BDO de las rutas bioquímicas para dar 1,4-butanodiol en *E. coli* se detalla a continuación. Se utilizaron tres condiciones, anaerobias, anaerobias + adición de nitrato, y aerobias. Los rendimientos teóricos máximos de cada escenario, suponiendo que la producción de BDO debe ser energéticamente neutra, se muestran en la Tabla 5. La Tabla 5 muestra los rendimientos teóricos máximos de 1,4-butanodiol (BDO) para cinco conjuntos de condiciones ambientales: 1) respiración aerobia, 2) fermentación anaerobia con producción simultánea de acetato, 3) fermentación anaerobia con producción simultánea de etanol, 4) respiración de nitrato que conduce a la formación de nitrito, y 5) respiración de nitrato que conduce a la formación de amoníaco. Los valores negativos indican captación del metabolito; los valores positivos indican secreción del metabolito. Se suponen unidades molares, junto con la neutralidad energética de la ruta. El rendimiento teórico máximo sin suponer neutralidad energética es de 1,091 mol/mol (0,545 g/g) de glucosa para todos los casos. El mayor rendimiento se obtiene en condiciones aerobias, cuando se puede generar suficiente ATP para mantener la ruta energéticamente neutra con pérdida mínima de carbono mediante la respiración. En el caso anaerobio, el rendimiento disminuye a medida que el ATP se fabrica mediante fosforilación del sustrato, y se produce como subproducto acetato o etanol. La adición controlada de nitrato puede proporcionar prácticamente el mismo rendimiento que el oxígeno, dependiendo la cantidad exacta de si se produce una reducción adicional del nitrito a amoníaco.

Tabla 5. Rendimientos teóricos máximos de 1,4-butanodiol (BDO) para cinco conjuntos de condiciones ambientales.

	Aeróbicas	Anaeróbicas			
		Producción de acetato	Prod. sim. de etanol	Nitrato a nitrito	Nitrato a amoníaco
Glucosa	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	1,000
Oxígeno	-0,068				
Nitrato				-0,147	-0,092
H ⁺		0,144			-0,184
H ₂ O	0,607	0,519	0,498	0,612	0,621
CO ₂	1,686	1,558	1,668	1,690	1,770
Nitrito				0,147	
Amoníaco					0,092
Acetato		0,144			
Etanol			0,173		
BDO	1,079	1,039	0,997	1,078	1,058

Si se supone que fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa funciona en la dirección desde el fosfoenolpiruvato hasta el oxaloacetato, la producción de BDO se convierte en un generador de energía, y el rendimiento teórico máximo para todos los escenarios pasa a ser de 0,545 g/g con el CO₂ como único subproducto. Se sabe que PEP carboxiquinasa produce oxaloacetato a partir de PEP en bacterias de rumiantes tales como *Mannheimia succiniciproducens* (Hong et al., *Nat. Biotechnol.* 22:1275-1281 (2004)). Sin embargo, se cree que el papel de la

PEP carboxiquinasa en la producción de oxaloacetato en *E. coli* es minoritario en comparación con PEP carboxilasa, posiblemente debido a la mayor K_m del bicarbonato de la PEP carboxiquinasa (Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 70:1238-1241 (2004)). Sin embargo, la actividad de la PEP carboxiquinasa natural de *E. coli* desde PEP en dirección al oxaloacetato se ha demostrado recientemente en mutantes ppc de K-12 (Kwon et al., J. Microbiol. Biotechnol. 16:1448-1452 (2006)).

En más detalle, los diseños identificados para aumentar la producción de BDO en *E. coli* se describen a continuación. Se supone un requisito de mantenimiento energético no asociado con el crecimiento de 7,6 mmol/gDW/h junto con una tasa de captación de glucosa máxima específica de 20 mmol/gDW/h. Se supone que BDO se exporta mediante difusión. Se identificaron estrategias de desactivación suponiendo que 1) PEP carboxiquinasa es irreversible y solamente funciona para convertir oxaloacetato en PEP y 2) PEP carboxiquinasa es reversible. Para ambos casos, el código de OptKnock descrito en Burgard et al. (Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)) se modificó para permitir una respiración limitada, no limitada, o ninguna, de nitrato. Añadir la posibilidad de respiración de nitrato sirve para aumentar el rendimiento teórico máximo de BDO cuando se supone que la PEP carboxiquinasa es irreversible y también, en algunos casos, permite la selección de estrategias de desactivación que no se seleccionarían de otra manera en condiciones anaerobias debido al rendimiento energético desfavorable. Específicamente, se añadieron seis reacciones de captación de nitrato a la red de *E. coli* con límites inferiores de 0, -2, -5, -10, -20, o -1000 mmol/gDW/h (el valor negativo significa captación del metabolito en el modelo estequiométrico). Las restricciones dobles de OptKnock se ajustaron de acuerdo con ello, y se añadió una restricción adicional que permitía activar solamente una reacción de captación de nitrato cada vez. OptKnock selecciona la cantidad de respiración de nitrato óptima para cada estrategia de desactivación identificada. Finalmente, todas las simulaciones suponen que la reacción catalizada por adhE en *E. coli* (esto es, $\text{acetil-CoA} + \text{NADH} \rightarrow \text{etanol} + \text{NAD}$) se ha eliminado. Como el acetil-CoA es un compuesto intermedio necesario para la producción de BDO, casi todos los diseños OptKnock incluirían esta delección, de todos modos, para evitar que la producción de etanol compita con la producción de BDO. La inclusión de esta delección se realizó a priori para disminuir el tiempo de CPU en el procedimiento informático.

Las estrategias de desactivación derivadas mediante OptKnock se proporcionan en las Tablas 6 y 7 suponiendo que PEP carboxiquinasa es irreversible y reversible, respectivamente. En la presente memoria descriptiva, las estrategias de desactivación se relacionan mediante abreviaturas de reacción en mayúsculas por razones de simplicidad. Los correspondientes genes que se deberían desactivar para evitar que se produzca una reacción concreta en *E. coli* se proporcionan en la Tabla 8 junto con la estequiometría de la reacción. Los nombres de los metabolitos correspondientes a la Tabla 8 se relacionan en la Tabla 9.

Tabla 6. Estrategias de desactivación derivadas mediante OptKnock, suponiendo que PEP carboxiquinasa es irreversible.

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
1	ADHER		5,67	0,57	25,42	0,00	-5,74	28,42	-20,00	0,00	57,91
2	ADHER, PFLi		9,95	0,50	22,31	0,00	14,90	0,00	-20,00	0,00	25,85
3	ADHER, NADH6		6,92	0,52	25,03	0,00	-0,07	20,82	-20,00	0,00	49,54
4	ADHER, THD2		6,55	0,56	23,75	0,00	-3,54	26,67	-20,00	0,00	54,38
5	ADHER, PGI		6,21	0,30	28,99	0,00	-5,98	30,57	-20,00	0,00	61,72
6	ADHER, PFK		6,13	0,31	29,10	0,00	-6,17	30,70	-20,00	0,00	61,98
7	ADHER, FBA		6,13	0,31	29,10	0,00	-6,17	30,70	-20,00	0,00	61,98
8	ADHER, ATPS4r		6,15	0,61	23,38	0,00	-3,10	26,55	-20,00	0,00	54,24
9	ADHER, TPI		6,13	0,31	29,10	0,00	-6,17	30,70	-20,00	0,00	61,98
11	ADHER, RPE		5,78	0,57	25,20	0,00	-5,45	28,19	-20,00	0,00	57,44
12	ADHER, GLQpts		5,78	0,51	26,33	0,00	-5,85	28,99	-20,00	0,00	58,92
13	ADHER, GLUDy		5,77	0,52	26,20	0,00	-5,84	28,90	-20,00	0,00	58,78
14	ADHER, TAL		5,73	0,57	25,30	0,00	-5,59	28,30	-20,00	0,00	57,67
15	ADHER, MDH		5,73	0,54	25,90	0,00	-5,80	28,72	-20,00	0,00	58,44
16	ADHER, FUM		5,73	0,54	25,90	0,00	-5,80	28,72	-20,00	0,00	58,44
17	ADHER, CBMK2		5,68	0,57	25,48	0,00	-5,75	28,46	-20,00	0,00	57,99
18	ADHER, HEX1, PGI		11,82	0,22	18,07	0,00	8,10	19,23	-20,00	0,00	38,88
19	ADHER, EDA, PGI		11,82	0,22	18,05	0,00	8,10	19,22	-20,00	0,00	38,86
20	ADHER, PFLi, PGI		10,87	0,20	25,96	0,00	16,29	0,00	-20,00	0,00	27,38
21	ADHER, FBA, PFLi		10,83	0,20	26,02	0,00	16,23	0,00	-20,00	0,00	27,46
22	ADHER, PFLi, TPI		10,83	0,20	26,02	0,00	16,23	0,00	-20,00	0,00	27,46
23	ADHER, PFK, PFLi		10,83	0,20	26,02	0,00	16,23	0,00	-20,00	0,00	27,46
24	ADHER, PFLi, THD2		10,49	0,49	21,02	0,00	15,71	0,00	-20,00	0,00	24,49
25	ADHER, GLQpts, PFLi		10,15	0,43	23,16	0,00	15,20	0,00	-20,00	0,00	26,22
26	ADHER, GLUDy, PFL		10,10	0,45	22,94	0,00	15,12	0,00	-20,00	0,00	26,12
27	ADHER, PFLi, RPE		10,02	0,50	22,14	0,00	15,00	0,00	-20,00	0,00	25,67
28	ADHER, PFLi, TAL		9,99	0,50	22,22	0,00	14,95	0,00	-20,00	0,00	25,76
29	ADHER, CBMK2, PFLi		9,96	0,49	22,36	0,00	14,92	0,00	-20,00	0,00	25,87
30	ADHER, ATPS4r, PGI		8,97	0,26	23,60	0,00	0,95	24,98	-20,00	0,00	50,46
31	ADHER, ATPS4r, NADH6		8,62	0,48	23,04	0,00	6,28	13,23	-20,00	0,00	39,68

	Transformaciones destinadas a eliminación t. ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
32	ADHEr, ATPS4r, TPI		8,26	0,26	27,70	0,00	3,99	16,78	-20,00	0,00	46,33
33	ADHEr, ATPS4r, PFK		8,26	0,26	27,70	0,00	3,99	16,78	-20,00	0,00	46,33
34	ADHEr, ATPS4r, FBA		8,26	0,26	27,70	0,00	3,99	16,78	-20,00	0,00	46,33
35	ADHEr, NADH6, THD2		7,88	0,50	23,49	0,00	2,67	18,21	-20,00	0,00	45,24
36	ADHEr, ATPS4r, FUM		7,86	0,49	22,44	0,00	0,04	23,43	-20,00	0,00	49,33
37	ADHEr, ATPS4r, MDH		7,86	0,49	22,44	0,00	0,04	23,43	-20,00	0,00	49,33
38	ADHEr, NADH6, PGI		7,58	0,23	28,71	0,00	0,18	22,36	-20,00	0,00	52,73
39	ADHEr, FUM, THD2		7,55	0,49	22,66	0,00	-1,33	25,25	-20,00	0,00	51,43
40	ADHEr, MDH, THD2		7,55	0,49	22,66	0,00	-1,33	25,25	-20,00	0,00	51,43
41	ADHEr, NADH6, PFK		7,50	0,24	28,80	0,00	-0,03	22,54	-20,00	0,00	53,03
42	ADHEr, FBA, NADH6		7,50	0,24	28,80	0,00	-0,03	22,54	-20,00	0,00	53,03
43	ADHEr, NADH6, TPI		7,50	0,24	28,80	0,00	-0,03	22,54	-20,00	0,00	53,03
44	ADHEr, GLCpts, NADH6		7,06	0,45	25,94	0,00	-0,06	21,24	-20,00	0,00	50,38
45	ADHEr, NADH6, RPE		7,05	0,52	24,82	0,00	0,30	20,47	-20,00	0,00	48,96
46	ADHEr, GLUDY, NADH6		7,02	0,47	25,73	0,00	-0,06	21,14	-20,00	0,00	50,18
47	ADHEr, FUM, NADH6		7,01	0,47	25,63	0,00	-0,06	21,10	-20,00	0,00	50,09
48	ADHEr, MDH, NADH6		7,01	0,47	25,63	0,00	-0,06	21,10	-20,00	0,00	50,09
49	ADHEr, NADH6, TAL		6,98	0,52	24,92	0,00	0,12	20,64	-20,00	0,00	49,23
50	ADHEr, GLCpts, THD2		6,56	0,49	24,86	0,00	-3,91	27,44	-20,00	0,00	55,80
51	ADHEr, GLUDY, THD2		6,56	0,50	24,67	0,00	-3,84	27,31	-20,00	0,00	55,57
52	ADHEr, PGI, SUCD4		6,33	0,22	30,11	0,00	-6,16	31,28	-20,00	0,00	62,99
53	ADHEr, GLCpts, PGI		6,28	0,26	29,59	0,00	-6,08	30,96	-20,00	0,00	62,41
54	ADHEr, HEX1, PFK		6,28	0,22	30,24	0,00	-6,31	31,41	-20,00	0,00	63,24
55	ADHEr, FBA, HEX1		6,28	0,22	30,24	0,00	-6,31	31,41	-20,00	0,00	63,24
56	ADHEr, HEX1, TPI		6,28	0,22	30,24	0,00	-6,31	31,41	-20,00	0,00	63,24
57	ADHEr, PFK, SUCD4		6,27	0,23	30,17	0,00	-6,30	31,37	-20,00	0,00	63,17
58	ADHEr, FBA, SUCD4		6,27	0,23	30,17	0,00	-6,30	31,37	-20,00	0,00	63,17
59	ADHEr, SUCD4, TPI		6,27	0,23	30,17	0,00	-6,30	31,37	-20,00	0,00	63,17
60	ADHEr, GLUDY, PGI		6,26	0,27	29,44	0,00	-6,06	30,86	-20,00	0,00	62,23
61	ADHEr, GLCpts, TPI		6,21	0,26	29,69	0,00	-6,24	31,07	-20,00	0,00	62,64
62	ADHEr, GLCpts, PFK		6,21	0,26	29,69	0,00	-6,24	31,07	-20,00	0,00	62,64

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
63	ADHER, FBA, GLCpts		6,21	0,26	29,69	0,00	-6,24	31,07	-20,00	0,00	62,64
64	ADHER, PFK, RPE		6,20	0,30	29,01	0,00	-6,02	30,60	-20,00	0,00	61,77
65	ADHER, FBA, RPE		6,20	0,30	29,01	0,00	-6,02	30,60	-20,00	0,00	61,77
66	ADHER, RPE, TPI		6,20	0,30	29,01	0,00	-6,02	30,60	-20,00	0,00	61,77
67	ADHER, GLUDy, TPI		6,19	0,27	29,54	0,00	-6,23	30,98	-20,00	0,00	62,47
68	ADHER, FBA, GLUDy		6,19	0,27	29,54	0,00	-6,23	30,98	-20,00	0,00	62,47
69	ADHER, GLUDy, PFK		6,19	0,27	29,54	0,00	-6,23	30,98	-20,00	0,00	62,47
70	ADHER, TAL, TPI		6,17	0,31	29,05	0,00	-6,09	30,65	-20,00	0,00	61,87
71	ADHER, PFK, TAL		6,17	0,31	29,05	0,00	-6,09	30,65	-20,00	0,00	61,87
72	ADHER, FBA, TAL		6,17	0,31	29,05	0,00	-6,09	30,65	-20,00	0,00	61,87
73	ADHER, ATPS4r, GLUDy		6,17	0,55	24,36	0,00	-3,40	27,23	-20,00	0,00	55,50
74	ADHER, PYK, SUCD4		6,00	0,38	28,04	0,00	-6,05	30,04	-20,00	0,00	60,81
75	ADHER, GLCpts, SUCD4		5,97	0,40	27,84	0,00	-6,03	29,92	-20,00	0,00	60,59
76	ADHER, RPE, SUCD4		5,95	0,46	26,74	0,00	-5,68	29,16	-20,00	0,00	59,19
77	ADHER, FUM, GLUDy		5,94	0,42	27,58	0,00	-6,00	29,76	-20,00	0,00	60,30
78	ADHER, GLUDy, MDH		5,94	0,42	27,58	0,00	-6,00	29,76	-20,00	0,00	60,30
79	ADHER, GLUDy, SUCD4		5,94	0,42	27,54	0,00	-5,99	29,74	-20,00	0,00	60,27
80	ADHER, SUCD4, TAL		5,90	0,46	26,81	0,00	-5,79	29,24	-20,00	0,00	59,36
81	ADHER, GLCpts, RPE		5,89	0,51	26,14	0,00	-5,59	28,78	-20,00	0,00	58,51
82	ADHER, GLCpts, GLUDy		5,87	0,46	27,02	0,00	-5,93	29,42	-20,00	0,00	59,69
83	ADHER, GLCpts, MDH		5,85	0,47	26,83	0,00	-5,91	29,29	-20,00	0,00	59,47
84	ADHER, FUM, GLCpts		5,85	0,47	26,83	0,00	-5,91	29,29	-20,00	0,00	59,47
85	ADHER, GLUDy, RPE		5,87	0,52	26,00	0,00	-5,57	28,69	-20,00	0,00	58,35
86	ADHER, GLCpts, TAL		5,84	0,51	26,23	0,00	-5,72	28,88	-20,00	0,00	58,71
87	ADHER, FUM, RPE		5,84	0,54	25,70	0,00	-5,53	28,50	-20,00	0,00	58,02
88	ADHER, MDH, RPE		5,84	0,54	25,70	0,00	-5,53	28,50	-20,00	0,00	58,02
89	ADHER, MDH, PYK		5,82	0,47	26,84	0,00	-5,98	29,28	-20,00	0,00	59,61
90	ADHER, FUM, PYK		5,82	0,47	26,84	0,00	-5,98	29,28	-20,00	0,00	59,61
91	ADHER, MDH, TAL		5,79	0,54	25,79	0,00	-5,66	28,61	-20,00	0,00	58,22
92	ADHER, FUM, TAL		5,79	0,54	25,79	0,00	-5,66	28,61	-20,00	0,00	58,22
93	ADHER, GLUDy, TAL		5,82	0,52	26,09	0,00	-5,70	28,79	-20,00	0,00	58,55

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas †, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
94	ADHer, CBMK2, GLU5K		5,68	0,57	25,51	0,00	-5,76	28,48	-20,00	0,00	58,02
95	ADHer, CBMK2, G5SD		5,68	0,57	25,51	0,00	-5,76	28,48	-20,00	0,00	58,02
96	ADHer, ASNS2, CBMK2		5,68	0,57	25,51	0,00	-5,76	28,48	-20,00	0,00	58,02
97	ADHer, CBMK2, SO4t2		5,68	0,57	25,50	0,00	-5,75	28,47	-20,00	0,00	58,00
98	ADHer, CBMK2, HEX1		5,68	0,57	25,48	0,00	-5,75	28,46	-20,00	0,00	57,99
99	ADHer, EDA, PFLi, PGI		14,76	0,16	16,11	0,00	22,13	0,00	-20,00	0,00	17,24
100	ADHer, EDA, NADH6, PGI		14,39	0,13	16,96	0,00	21,96	1,24	-20,00	0,00	19,11
101	ADHer, FRD2, GLUDy, LDH_D		12,91	0,12	12,29	0,00	-0,02	38,75	-20,00	0,00	51,90
102	ADHer, FRD2, LDH_D, THD2		12,89	0,13	12,25	0,00	-0,02	38,70	-20,00	0,00	51,85
103	ADHer, ACKr, ACS, PPC		12,62	0,11	12,68	0,00	0,33	39,20	-20,00	0,00	52,67
104	ADHer, GLUDy, LDH_D, PPC		12,60	0,16	11,81	0,00	0,47	38,84	-20,00	0,00	51,79
105	ADHer, LDH_D, PPC, THD2		12,60	0,16	11,72	0,00	0,49	38,81	-20,00	0,00	51,71
106	ADHer, ATPS4r, EDA, PGI		11,95	0,15	19,06	0,00	8,00	19,85	-20,00	0,00	39,98
107	ADHer, EDA, GLCpts, PGI		11,95	0,15	19,03	0,00	8,00	19,83	-20,00	0,00	39,94
108	ADHer, EDA, GLUDy, PGI		11,86	0,20	18,37	0,00	8,07	19,42	-20,00	0,00	39,21
109	ADHer, GLUDy, HEX1, PGI		11,85	0,20	18,38	0,00	8,05	19,43	-20,00	0,00	39,24
110	ADHer, ATPS4r, FRD2, LDH_D		11,72	0,28	7,78	0,00	9,70	25,16	-20,00	0,00	37,14
111	ADHer, ACKr, NADH6, PYK		11,48	0,56	11,79	0,00	27,19	0,00	-20,00	0,00	15,78
112	ADHer, ACKr, LDH_D, NADH6		11,02	0,64	11,37	0,00	26,49	0,00	-20,00	0,00	15,94
113	ADHer, GLCpts, PFLi, PGI		10,95	0,17	26,34	0,00	16,41	0,00	-20,00	0,00	27,55
114	ADHer, GLUDy, PFLi, PGI		10,93	0,18	26,24	0,00	16,38	0,00	-20,00	0,00	27,51
115	ADHer, FBA, GLCpts, PFLi		10,91	0,17	26,39	0,00	16,36	0,00	-20,00	0,00	27,62
116	ADHer, GLCpts, PFK, PFLi		10,91	0,17	26,39	0,00	16,36	0,00	-20,00	0,00	27,62
117	ADHer, GLCpts, PFLi, TPI		10,91	0,17	26,39	0,00	16,36	0,00	-20,00	0,00	27,62
118	ADHer, FBA, GLUDy, PFLi		10,89	0,18	26,30	0,00	16,33	0,00	-20,00	0,00	27,58
119	ADHer, GLUDy, PFK, PFLi		10,89	0,18	26,30	0,00	16,33	0,00	-20,00	0,00	27,58
120	ADHer, GLUDy, PFLi, TPI		10,89	0,18	26,30	0,00	16,33	0,00	-20,00	0,00	27,58
121	ADHer, FBA, PFLi, RPE		10,86	0,20	25,97	0,00	16,28	0,00	-20,00	0,00	27,40
122	ADHer, PFLi, RPE, TPI		10,86	0,20	25,97	0,00	16,28	0,00	-20,00	0,00	27,40
123	ADHer, PFK, PFLi, RPE		10,86	0,20	25,97	0,00	16,28	0,00	-20,00	0,00	27,40
124	ADHer, PFK, PFLi, TAL		10,85	0,20	26,00	0,00	16,25	0,00	-20,00	0,00	27,43

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡ #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
125	ADHER, PFLi, TAL, TPI		10,85	0,20	26,00	0,00	16,25	0,00	-20,00	0,00	27,43
126	ADHER, FBA, PFLi, TAL		10,85	0,20	26,00	0,00	16,25	0,00	-20,00	0,00	27,43
127	ADHER, ATPS4r, NADH6, PGI		10,64	0,17	23,71	0,00	8,96	13,97	-20,00	0,00	38,90
128	ADHER, GLQpts, PFLi, THD2		10,62	0,42	22,05	0,00	15,90	0,00	-20,00	0,00	25,05
129	ADHER, GLUDy, PFLi, THD2		10,59	0,44	21,77	0,00	15,85	0,00	-20,00	0,00	24,89
130	ADHER, LDH_D, PFLi, SUCD4		10,53	0,30	24,78	0,00	15,78	0,00	-20,00	0,00	26,92
131	ADHER, LDH_D, NADH6, PFLi		10,31	0,38	23,85	0,00	15,45	0,00	-20,00	0,00	26,52
132	ADHER, ATPS4r, LDH_D, SUCD4		10,30	0,35	21,88	0,00	12,39	8,06	-20,00	0,00	32,44
133	ADHER, FUM, PFLi, PYK		10,29	0,38	23,75	0,00	15,41	0,00	-20,00	0,00	26,47
134	ADHER, MDH, PFLi, PYK		10,29	0,38	23,75	0,00	15,41	0,00	-20,00	0,00	26,47
135	ADHER, GLQpts, GLUDy, PFLi		10,28	0,39	23,71	0,00	15,40	0,00	-20,00	0,00	26,46
136	ADHER, GLQpts, PFLi, RPE		10,21	0,43	23,02	0,00	15,29	0,00	-20,00	0,00	26,07
137	ADHER, GLQpts, PFLi, TAL		10,18	0,43	23,09	0,00	15,25	0,00	-20,00	0,00	26,14
138	ADHER, GLUDy, PFLi, RPE		10,16	0,45	22,79	0,00	15,22	0,00	-20,00	0,00	25,96
139	ADHER, CBMK2, GLQpts, PFLi		10,16	0,43	23,21	0,00	15,22	0,00	-20,00	0,00	26,24
140	ADHER, LDH_D, MDH, PFLi		10,15	0,43	23,14	0,00	15,19	0,00	-20,00	0,00	26,21
141	ADHER, FUM, LDH_D, PFLi		10,15	0,43	23,14	0,00	15,19	0,00	-20,00	0,00	26,21
142	ADHER, GLUDy, PFLi, TAL		10,13	0,45	22,86	0,00	15,17	0,00	-20,00	0,00	26,04
143	ADHER, CBMK2, GLUDy, PFLi		10,11	0,44	22,98	0,00	15,14	0,00	-20,00	0,00	26,14
144	ADHER, CBMK2, PFLi, RPE		10,04	0,49	22,20	0,00	15,02	0,00	-20,00	0,00	25,69
145	ADHER, CBMK2, PFLi, TAL		10,00	0,49	22,28	0,00	14,97	0,00	-20,00	0,00	25,78
146	ADHER, ASNS2, G5SD, PFLi		9,96	0,49	22,35	0,00	14,91	0,00	-20,00	0,00	25,87
147	ADHER, ASNS2, GLU5K, PFLi		9,96	0,49	22,35	0,00	14,91	0,00	-20,00	0,00	25,87
148	ADHER, ATPS4r, GLQpts, MDH		9,96	0,37	21,98	0,00	9,04	11,74	-20,00	0,00	36,36
149	ADHER, ATPS4r, FUM, GLCpts		9,96	0,37	21,98	0,00	9,04	11,74	-20,00	0,00	36,36
150	ADHER, ATPS4r, FBA, NADH6		9,87	0,17	27,44	0,00	11,15	7,29	-20,00	0,00	35,96
151	ADHER, ATPS4r, NADH6, TPI		9,87	0,17	27,44	0,00	11,15	7,29	-20,00	0,00	35,96
152	ADHER, ATPS4r, NADH6, PFK		9,87	0,17	27,44	0,00	11,15	7,29	-20,00	0,00	35,96
153	ADHER, ATPS4r, FUM, PGL		9,82	0,44	23,35	0,00	13,64	2,12	-20,00	0,00	28,60
154	ADHER, ATPS4r, MDH, PGDH		9,82	0,44	23,35	0,00	13,64	2,12	-20,00	0,00	28,60
155	ADHER, ATPS4r, FUM, G6PDHy		9,82	0,44	23,35	0,00	13,64	2,12	-20,00	0,00	28,60

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas †, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
156	ADHER, ATPS4r, FUM, PGDH		9,82	0,44	23,35	0,00	13,64	2,12	-20,00	0,00	28,60
157	ADHER, ATPS4r, MDH, PGL		9,82	0,44	23,35	0,00	13,64	2,12	-20,00	0,00	28,60
158	ADHER, ATPS4r, G6PDHy, MDH		9,82	0,44	23,35	0,00	13,64	2,12	-20,00	0,00	28,60
159	ADHER, ATPS4r, LDH_D, PPC		9,81	0,44	12,15	0,00	1,32	36,78	-20,00	0,00	52,07
160	ADHER, ATPS4r, FUM, TAL		9,77	0,44	23,32	0,00	13,29	2,67	-20,00	0,00	29,13
161	ADHER, ATPS4r, MDH, TAL		9,77	0,44	23,32	0,00	13,29	2,67	-20,00	0,00	29,13
162	ADHER, ATPS4r, GLOpts, NADH6		9,76	0,42	22,90	0,00	13,62	4,00	-20,00	0,00	29,90
163	ADHER, ATPS4r, MDH, RPE		9,72	0,44	23,30	0,00	12,97	3,18	-20,00	0,00	29,62
164	ADHER, ATPS4r, FUM, RPE		9,72	0,44	23,30	0,00	12,97	3,18	-20,00	0,00	29,62
165	ADHER, ATPS4r, NADH6, PGDH		9,39	0,46	23,42	0,00	11,71	4,69	-20,00	0,00	31,40
166	ADHER, ATPS4r, NADH6, PGL		9,39	0,46	23,42	0,00	11,71	4,69	-20,00	0,00	31,40
167	ADHER, ATPS4r, G6PDHy, NADH6		9,39	0,46	23,42	0,00	11,71	4,69	-20,00	0,00	31,40
168	ADHER, ATPS4r, NADH6, TAL		9,34	0,46	23,40	0,00	11,35	5,25	-20,00	0,00	31,94
169	ADHER, ATPS4r, NADH6, RPE		9,29	0,46	23,37	0,00	11,02	5,76	-20,00	0,00	32,44
170	ADHER, G6PDHy, ME2, THD2		9,08	0,43	19,50	0,00	0,35	26,49	-20,00	0,00	49,05
171	ADHER, ME2, PGL, THD2		9,08	0,43	19,50	0,00	0,35	26,49	-20,00	0,00	49,05
172	ADHER, G6PDHy, PPC, THD2		8,99	0,47	0,00	0,00	6,58	33,74	-20,00	0,00	45,14
173	ADHER, PGL, PPC, THD2		8,99	0,47	0,00	0,00	6,58	33,74	-20,00	0,00	45,14
174	ADHER, ATPS4r, GLUDy, NADH6		8,65	0,43	23,82	0,00	6,11	13,67	-20,00	0,00	40,57
175	ADHER, ACKr, FRD2, LDH_D		8,46	0,64	8,81	0,00	9,05	20,63	-20,00	0,00	37,61
176	ADHER, ATPS4r, FBA, RPE		8,29	0,26	27,65	0,00	3,98	16,88	-20,00	0,00	46,36
177	ADHER, ATPS4r, RPE, TPI		8,29	0,26	27,65	0,00	3,98	16,88	-20,00	0,00	46,36
178	ADHER, ATPS4r, PFK, RPE		8,29	0,26	27,65	0,00	3,98	16,88	-20,00	0,00	46,36
179	ADHER, ATPS4r, GLUDy, PFK		8,28	0,23	28,10	0,00	3,79	17,22	-20,00	0,00	46,98
180	ADHER, ATPS4r, GLUDy, TPI		8,28	0,23	28,10	0,00	3,79	17,22	-20,00	0,00	46,98
181	ADHER, ATPS4r, FBA, GLUDy		8,28	0,23	28,10	0,00	3,79	17,22	-20,00	0,00	46,98
182	ADHER, ATPS4r, PFK, TAL		8,28	0,26	27,67	0,00	3,98	16,83	-20,00	0,00	46,35
183	ADHER, ATPS4r, TAL, TPI		8,28	0,26	27,67	0,00	3,98	16,83	-20,00	0,00	46,35
184	ADHER, ATPS4r, FBA, TAL		8,28	0,26	27,67	0,00	3,98	16,83	-20,00	0,00	46,35
185	ADHER, ASPT, MDH, PYK		8,16	0,28	23,57	0,00	-4,24	32,94	-20,00	0,00	58,48
186	ADHER, MDH, PGL, THD2		8,00	0,71	13,36	0,00	7,12	24,68	-20,00	0,00	43,08

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
187	ADHER, G6PDH, MDH, THD2		8,00	0,71	13,36	0,00	7,12	24,68	-20,00	0,00	43,08
188	ADHER, GLCpts, NADH6, THD2		7,89	0,43	24,60	0,00	2,33	18,97	-20,00	0,00	46,64
189	ADHER, GLUDy, NADH6, THD2		7,89	0,45	24,31	0,00	2,42	18,77	-20,00	0,00	46,27
190	ADHER, ASPT, LDH_D, MDH		7,71	0,45	21,65	0,00	-4,12	31,31	-20,00	0,00	56,15
191	ADHER, GLCpts, NADH6, PGI		7,65	0,19	29,27	0,00	0,15	22,63	-20,00	0,00	53,28
192	ADHER, LDH_D, SUCD4, THD2		7,64	0,40	24,07	0,00	-1,65	26,18	-20,00	0,00	53,11
193	ADHER, GLUDy, NADH6, PGI		7,62	0,21	29,06	0,00	0,16	22,53	-20,00	0,00	53,08
194	ADHER, ACKr, FUM, LDH_D		7,62	0,32	7,79	0,00	-2,23	9,47	-20,00	0,00	37,34
195	ADHER, FBA, GLCpts, NADH6		7,59	0,20	29,34	0,00	-0,03	22,79	-20,00	0,00	53,53
196	ADHER, GLCpts, NADH6, TPI		7,59	0,20	29,34	0,00	-0,03	22,79	-20,00	0,00	53,53
197	ADHER, ACKr, LDH_D, MDH		7,62	0,32	7,79	0,00	-2,23	9,47	-20,00	0,00	37,34
198	ADHER, GLCpts, NADH6, PFK		7,59	0,20	29,34	0,00	-0,03	22,79	-20,00	0,00	53,53
199	ADHER, GLCpts, MDH, THD2		7,58	0,43	23,76	0,00	-1,67	26,01	-20,00	0,00	52,82
200	ADHER, FUM, GLCpts, THD2		7,58	0,43	23,76	0,00	-1,67	26,01	-20,00	0,00	52,82
201	ADHER, NADH6, PFK, RPE		7,57	0,23	28,73	0,00	0,14	22,39	-20,00	0,00	52,79
202	ADHER, FBA, NADH6, RPE		7,57	0,23	28,73	0,00	0,14	22,39	-20,00	0,00	52,79
203	ADHER, NADH6, RPE, TPI		7,57	0,23	28,73	0,00	0,14	22,39	-20,00	0,00	52,79
204	ADHER, GLUDy, NADH6, TPI		7,56	0,21	29,14	0,00	-0,03	22,70	-20,00	0,00	53,35
205	ADHER, GLUDy, NADH6, PFK		7,56	0,21	29,14	0,00	-0,03	22,70	-20,00	0,00	53,35
206	ADHER, FBA, GLUDy, NADH6		7,56	0,21	29,14	0,00	-0,03	22,70	-20,00	0,00	53,35
207	ADHER, NADH6, PFK, TAL		7,54	0,24	28,76	0,00	0,06	22,46	-20,00	0,00	52,90
208	ADHER, FBA, NADH6, TAL		7,54	0,24	28,76	0,00	0,06	22,46	-20,00	0,00	52,90
209	ADHER, NADH6, TAL, TPI		7,54	0,24	28,76	0,00	0,06	22,46	-20,00	0,00	52,90
210	ADHER, ACKr, AKGD, ATPS4r		7,24	0,58	7,55	0,00	52,00	0,00	-20,00	0,00	11,65
211	ADHER, GLCpts, NADH6, RPE		7,17	0,45	25,76	0,00	0,26	20,93	-20,00	0,00	49,87
212	ADHER, FUM, GLCpts, NADH6		7,15	0,40	26,55	0,00	-0,06	21,52	-20,00	0,00	50,95
213	ADHER, GLCpts, MDH, NADH6		7,15	0,40	26,55	0,00	-0,06	21,52	-20,00	0,00	50,95
214	ADHER, GLCpts, GLUDy, NADH6		7,15	0,41	26,54	0,00	-0,06	21,51	-20,00	0,00	50,94
215	ADHER, FUM, NADH6, PYK		7,15	0,41	26,54	0,00	-0,06	21,51	-20,00	0,00	50,94
216	ADHER, MDH, NADH6, PYK		7,15	0,41	26,54	0,00	-0,06	21,51	-20,00	0,00	50,94
217	ADHER, ACKr, ATPS4r, SUCOAS		7,14	0,58	7,46	0,00	16,55	35,80	-20,00	0,00	47,39

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas †, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
218	ADHEr, GLUDy, NADH6, RPE		7,14	0,46	25,54	0,00	0,27	20,82	-20,00	0,00	49,66
219	ADHEr, MDH, NADH6, RPE		7,13	0,47	25,45	0,00	0,27	20,78	-20,00	0,00	49,57
220	ADHEr, FUM, NADH6, RPE		7,13	0,47	25,45	0,00	0,27	20,78	-20,00	0,00	49,57
221	ADHEr, GLCpts, NADH6, TAL		7,12	0,45	25,84	0,00	0,11	21,08	-20,00	0,00	50,11
222	ADHEr, GLUDy, NADH6, TAL		7,09	0,46	25,63	0,00	0,11	20,98	-20,00	0,00	49,91
223	ADHEr, FUM, NADH6, TAL		7,07	0,47	25,53	0,00	0,11	20,93	-20,00	0,00	49,82
224	ADHEr, MDH, NADH6, TAL		7,07	0,47	25,53	0,00	0,11	20,93	-20,00	0,00	49,82
225	ADHEr, CBMK2, GLU5K, NADH6		6,93	0,51	25,11	0,00	-0,07	20,86	-20,00	0,00	49,62
226	ADHEr, CBMK2, G5SD, NADH6		6,93	0,51	25,11	0,00	-0,07	20,86	-20,00	0,00	49,62
227	ADHEr, CBMK2, NADH6, SO4t2		6,93	0,51	25,10	0,00	-0,07	20,86	-20,00	0,00	49,60
228	ADHEr, ASNS2, CBMK2, NADH6		6,93	0,51	25,11	0,00	-0,07	20,86	-20,00	0,00	49,61
229	ADHEr, ATPS4r, PYK, SUCD4		6,69	0,36	19,85	0,00	7,01	7,99	-20,00	0,00	38,27
230	ADHEr, GLCpts, PGI, SUCD4		6,40	0,18	30,74	0,00	-6,26	31,69	-20,00	0,00	63,71
231	ADHEr, FUM, GLUDy, PGI		6,38	0,19	30,56	0,00	-6,23	31,57	-20,00	0,00	63,51
232	ADHEr, GLUDy, MDH, PGI		6,38	0,19	30,56	0,00	-6,23	31,57	-20,00	0,00	63,51
233	ADHEr, GLUDy, PGI, SUCD4		6,37	0,20	30,45	0,00	-6,21	31,50	-20,00	0,00	63,38
234	ADHEr, GLCpts, SUCD4, TPI		6,35	0,18	30,80	0,00	-6,37	31,76	-20,00	0,00	63,86
235	ADHEr, GLCpts, PFK, SUCD4		6,35	0,18	30,80	0,00	-6,37	31,76	-20,00	0,00	63,86
236	ADHEr, FBA, GLCpts, SUCD4		6,35	0,18	30,80	0,00	-6,37	31,76	-20,00	0,00	63,86
237	ADHEr, HEX1, RPE, TPI,		6,32	0,22	30,18	0,00	-6,20	31,34	-20,00	0,00	63,09
238	ADHEr, FBA, HEX1, RPE		6,32	0,22	30,18	0,00	-6,20	31,34	-20,00	0,00	63,09
239	ADHEr, HEX1, PFK, RPE		6,32	0,22	30,18	0,00	-6,20	31,34	-20,00	0,00	63,09
240	ADHEr, FUM, GLUDy, TPI		6,32	0,20	30,62	0,00	-6,35	31,65	-20,00	0,00	63,67
241	ADHEr, FBA, GLUDy, MDH		6,32	0,20	30,62	0,00	-6,35	31,65	-20,00	0,00	63,67
242	ADHEr, FUM, GLUDy, PFK		6,32	0,20	30,62	0,00	-6,35	31,65	-20,00	0,00	63,67
243	ADHEr, GLUDy, MDH, PFK		6,32	0,20	30,62	0,00	-6,35	31,65	-20,00	0,00	63,67
244	ADHEr, GLUDy, MDH, TPI		6,32	0,20	30,62	0,00	-6,35	31,65	-20,00	0,00	63,67
245	ADHEr, FBA, FUM, GLUDy		6,32	0,20	30,62	0,00	-6,35	31,65	-20,00	0,00	63,67
246	ADHEr, GLCpts, GLUDy, PGI		6,32	0,23	29,99	0,00	-6,14	31,21	-20,00	0,00	62,85
247	ADHEr, RPE, SUCD4, TPI		6,32	0,23	30,12	0,00	-6,19	31,30	-20,00	0,00	63,02
248	ADHEr, FBA, RPE, SUCD4		6,32	0,23	30,12	0,00	-6,19	31,30	-20,00	0,00	63,02

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas †, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
249	ADHeR, PFK, RPE, SUCD4		6,32	0,23	30,12	0,00	-6,19	31,30	-20,00	0,00	63,02
250	ADHeR, GLUDy, HEX1, PFK		6,31	0,20	30,55	0,00	-6,34	31,60	-20,00	0,00	63,59
251	ADHeR, GLUDy, HEX1, TPI		6,31	0,20	30,55	0,00	-6,34	31,60	-20,00	0,00	63,59
252	ADHeR, FBA, GLUDy, HEX1		6,31	0,20	30,55	0,00	-6,34	31,60	-20,00	0,00	63,59
253	ADHeR, FBA, GLUDy, SUCD4		6,31	0,20	30,51	0,00	-6,34	31,58	-20,00	0,00	63,55
254	ADHeR, GLUDy, SUCD4, TPI		6,31	0,20	30,51	0,00	-6,34	31,58	-20,00	0,00	63,55
255	ADHeR, GLUDy, PFK, SUCD4		6,31	0,20	30,51	0,00	-6,34	31,58	-20,00	0,00	63,55
256	ADHeR, FBA, HEX1, TAL		6,30	0,22	30,21	0,00	-6,25	31,37	-20,00	0,00	63,16
257	ADHeR, HEX1, PFK, TAL		6,30	0,22	30,21	0,00	-6,25	31,37	-20,00	0,00	63,16
258	ADHeR, HEX1, TAL, TPI		6,30	0,22	30,21	0,00	-6,25	31,37	-20,00	0,00	63,16
259	ADHeR, PFK, SUCD4, TAL		6,29	0,23	30,14	0,00	-6,24	31,33	-20,00	0,00	63,09
260	ADHeR, SUCD4, TAL, TPI		6,29	0,23	30,14	0,00	-6,24	31,33	-20,00	0,00	63,09
261	ADHeR, FBA, SUCD4, TAL		6,29	0,23	30,14	0,00	-6,24	31,33	-20,00	0,00	63,09
262	ADHeR, ACKr, LDH_D, SUCD4		6,28	0,22	6,40	0,00	-6,31	7,56	-20,00	0,00	39,41
263	ADHeR, GLCpts, RPE, TPI		6,26	0,26	29,61	0,00	-6,11	30,98	-20,00	0,00	62,45
264	ADHeR, GLCpts, PFK, RPE		6,26	0,26	29,61	0,00	-6,11	30,98	-20,00	0,00	62,45
265	ADHeR, FBA, GLCpts, RPE		6,26	0,26	29,61	0,00	-6,11	30,98	-20,00	0,00	62,45
266	ADHeR, AC16, LDH_D, MDH		6,26	0,23	0,00	0,00	-6,29	1,22	-20,00	0,00	32,99
267	ADHeR, GLCpts, GLUDy, TPI		6,26	0,24	30,08	0,00	-6,29	31,31	-20,00	0,00	63,07
268	ADHeR, AC16, FUM, LDH_D		6,26	0,23	0,00	0,00	-6,29	1,22	-20,00	0,00	32,99
269	ADHeR, FBA, GLCpts, GLUDy		6,26	0,24	30,08	0,00	-6,29	31,31	-20,00	0,00	63,07
270	ADHeR, GLCpts, GLUDy, PFK		6,26	0,24	30,08	0,00	-6,29	31,31	-20,00	0,00	63,07
271	ADHeR, GLUDy, RPE, TPI		6,25	0,27	29,46	0,00	-6,09	30,88	-20,00	0,00	62,28
272	ADHeR, FBA, GLUDy, RPE		6,25	0,27	29,46	0,00	-6,09	30,88	-20,00	0,00	62,28
273	ADHeR, GLUDy, PFK, RPE		6,25	0,27	29,46	0,00	-6,09	30,88	-20,00	0,00	62,28
274	ADHeR, GLCpts, TAL, TPI		6,24	0,26	29,65	0,00	-6,17	31,02	-20,00	0,00	62,54
275	ADHeR, FBA, GLCpts, TAL		6,24	0,26	29,65	0,00	-6,17	31,02	-20,00	0,00	62,54
276	ADHeR, GLCpts, PFK, TAL		6,24	0,26	29,65	0,00	-6,17	31,02	-20,00	0,00	62,54
277	ADHeR, GLUDy, PFK, TAL		6,22	0,27	29,50	0,00	-6,15	30,93	-20,00	0,00	62,37
278	ADHeR, FBA, GLUDy, TAL		6,22	0,27	29,50	0,00	-6,15	30,93	-20,00	0,00	62,37
279	ADHeR, GLUDy, TAL, TPI		6,22	0,27	29,50	0,00	-6,15	30,93	-20,00	0,00	62,37

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas †, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
280	ADHEr, GLUDy, MDH, PYK		6,09	0,33	28,74	0,00	-6,13	30,48	-20,00	0,00	61,59
281	ADHEr, FUM, GLUDy, PYK		6,09	0,33	28,74	0,00	-6,13	30,48	-20,00	0,00	61,59
282	ADHEr, PYK, RPE, SUCD4		6,08	0,38	27,93	0,00	-5,86	29,92	-20,00	0,00	60,54
283	ADHEr, GLUDy, PYK, SUCD4		6,08	0,34	28,65	0,00	-6,12	30,43	-20,00	0,00	61,49
284	ADHEr, MDH, PYK, SUCD4		6,06	0,35	28,51	0,00	-6,10	30,34	-20,00	0,00	61,33
285	ADHEr, FUM, PYK, SUCD4		6,06	0,35	28,51	0,00	-6,10	30,34	-20,00	0,00	61,33
286	ADHEr, GLCpts, RPE, SUCD4		6,06	0,40	27,70	0,00	-5,83	29,77	-20,00	0,00	60,29
287	ADHEr, GLCpts, GLUDy, MDH		6,05	0,35	28,44	0,00	-6,10	30,30	-20,00	0,00	61,26
288	ADHEr, FUM, GLCpts, GLUDy		6,05	0,35	28,44	0,00	-6,10	30,30	-20,00	0,00	61,26
289	ADHEr, GLCpts, GLUDy, SUCD4		6,04	0,36	28,39	0,00	-6,09	30,27	-20,00	0,00	61,21
290	ADHEr, PYK, SUCD4, TAL		6,04	0,38	27,98	0,00	-5,95	29,98	-20,00	0,00	60,67
291	ADHEr, GLUDy, MDH, RPE		6,03	0,41	27,44	0,00	-5,79	29,60	-20,00	0,00	59,98
292	ADHEr, FUM, GLUDy, RPE		6,03	0,41	27,44	0,00	-5,79	29,60	-20,00	0,00	59,98
293	ADHEr, GLUDy, RPE, SUCD4		6,02	0,42	27,40	0,00	-5,78	29,58	-20,00	0,00	59,94
294	ADHEr, GLCpts, SUCD4, TAL		6,02	0,40	27,77	0,00	-5,92	29,84	-20,00	0,00	60,43
295	ADHEr, GLUDy, MDH, TAL		5,99	0,42	27,50	0,00	-5,89	29,68	-20,00	0,00	60,14
296	ADHEr, FUM, GLUDy, TAL		5,99	0,42	27,50	0,00	-5,89	29,68	-20,00	0,00	60,14
297	ADHEr, GLUDy, SUCD4, TAL		5,98	0,42	27,47	0,00	-5,88	29,66	-20,00	0,00	60,10
298	ADHEr, GLCpts, GLUDy, RPE		5,96	0,46	26,84	0,00	-5,70	29,23	-20,00	0,00	59,31
299	ADHEr, FUM, GLCpts, RPE		5,94	0,47	26,66	0,00	-5,67	29,11	-20,00	0,00	59,10
300	ADHEr, GLCpts, MDH, RPE		5,94	0,47	26,66	0,00	-5,67	29,11	-20,00	0,00	59,10
301	ADHEr, FUM, LDH_D, SUCD4		5,92	0,43	27,41	0,00	-5,98	29,66	-20,00	0,00	60,12
302	ADHEr, LDH_D, MDH, SUCD4		5,92	0,43	27,41	0,00	-5,98	29,66	-20,00	0,00	60,12
303	ADHEr, GLCpts, GLUDy, TAL		5,92	0,46	26,93	0,00	-5,81	29,32	-20,00	0,00	59,49
304	ADHEr, FUM, GLCpts, TAL		5,90	0,47	26,74	0,00	-5,78	29,20	-20,00	0,00	59,28
305	ADHEr, GLCpts, MDH, TAL		5,90	0,47	26,74	0,00	-5,78	29,20	-20,00	0,00	59,28
306	ADHEr, CBMK2, GLU5K, SUCD4		5,86	0,46	26,97	0,00	-5,93	29,38	-20,00	0,00	59,63
307	ADHEr, CBMK2, G5SD, SUCD4		5,86	0,46	26,97	0,00	-5,93	29,38	-20,00	0,00	59,63
308	ADHEr, CBMK2, GLU5K, RPE		5,79	0,56	25,29	0,00	-5,47	28,25	-20,00	0,00	57,55
309	ADHEr, CBMK2, G5SD, RPE		5,79	0,56	25,29	0,00	-5,47	28,25	-20,00	0,00	57,55
310	ADHEr, CBMK2, GLCpts, GLU5K		5,79	0,50	26,42	0,00	-5,86	29,04	-20,00	0,00	59,02

	Transformaciones destinadas a eliminación f. t. #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
311	ADHEr, ASNS2, CBMK2, RPE	5,79	0,56	25,29	0,00	-5,47	28,25	-20,00	0,00	57,55
312	ADHEr, CBMK2, G5SD, GLCpts	5,79	0,50	26,42	0,00	-5,86	29,04	-20,00	0,00	59,02
313	ADHEr, ASNS2, CBMK2, GLCpts	5,79	0,50	26,42	0,00	-5,86	29,04	-20,00	0,00	59,02
314	ADHEr, CBMK2, GLU5K, TAL	5,74	0,57	25,40	0,00	-5,60	28,36	-20,00	0,00	57,77
315	ADHEr, CBMK2, G5SD, TAL	5,74	0,57	25,40	0,00	-5,60	28,36	-20,00	0,00	57,77
316	ADHEr, ASNS2, CBMK2, TAL	5,74	0,57	25,40	0,00	-5,60	28,36	-20,00	0,00	57,77
317	ADHEr, CBMK2, GLU5K, MDH	5,74	0,53	25,99	0,00	-5,81	28,77	-20,00	0,00	58,54
318	ADHEr, CBMK2, FUM, G5SD	5,74	0,53	25,99	0,00	-5,81	28,77	-20,00	0,00	58,54
319	ADHEr, CBMK2, G5SD, MDH	5,74	0,53	25,99	0,00	-5,81	28,77	-20,00	0,00	58,54
320	ADHEr, CBMK2, FUM, GLU5K	5,74	0,53	25,99	0,00	-5,81	28,77	-20,00	0,00	58,54
321	ADHEr, ASNS2, CBMK2, MDH	5,74	0,53	25,99	0,00	-5,81	28,77	-20,00	0,00	58,54
322	ADHEr, ASNS2, CBMK2, FUM	5,74	0,53	25,99	0,00	-5,81	28,77	-20,00	0,00	58,54
323	ADHEr, ASNS2, GLU5K, SO4t2	5,68	0,57	25,48	0,00	-5,75	28,46	-20,00	0,00	57,99
324	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi	14,96	0,23	14,07	0,00	22,42	0,00	-20,00	0,00	15,71
325	ADHEr, ADA, GLUDy, PFLi, PGI	14,81	0,14	16,32	0,00	22,21	0,00	-20,00	0,00	17,33
326	ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, GLCpts, MDH	14,63	0,18	15,95	0,00	21,94	0,00	-20,00	0,00	17,25
327	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, MDH, PGL	14,63	0,18	15,95	0,00	21,94	0,00	-20,00	0,00	17,25
328	ADHEr, ADA, GLUDy, NADH6, PGI	14,42	0,11	17,14	0,00	21,96	1,32	-20,00	0,00	19,28
329	ADHEr, G6PDHy, LDH_D, PPC, THD2	13,73	0,10	9,55	0,00	1,40	40,38	-20,00	0,00	50,65
330	ADHEr, LDH_D, PGL, PPC, THD2	13,73	0,10	9,55	0,00	1,40	40,38	-20,00	0,00	50,65
331	ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, NADH6	13,37	0,17	4,27	6,42	13,23	18,61	-20,00	0,00	30,48
332	ADHEr, ADA, LDH_D, PPC, THD2	13,09	0,16	10,61	0,00	1,33	38,58	-20,00	0,00	50,31
333	ADHEr, FRD2, GLUDy, LDH_D, RPE	12,96	0,12	12,19	0,00	0,07	38,74	-20,00	0,00	51,78
334	ADHEr, FRD2, LDH_D, RPE, THD2	12,95	0,12	12,13	0,00	0,07	38,68	-20,00	0,00	51,70
335	ADHEr, FRD2, GLUDy, LDH_D, THD2	12,94	0,11	12,36	0,00	-0,02	38,83	-20,00	0,00	52,00
336	ADHEr, FRD2, GLUDy, LDH_D, TAL	12,94	0,12	12,24	0,00	0,03	38,74	-20,00	0,00	51,84
337	ADHEr, FRD2, LDH_D, TAL, THD2	12,92	0,13	12,19	0,00	0,03	38,69	-20,00	0,00	51,77
338	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, NADH6, PPC	12,83	0,28	9,13	0,00	9,66	29,15	-20,00	0,00	40,26
339	ADHEr, ASPT, FUM, GLUDy, LDH_D	12,77	0,13	12,57	0,00	-0,13	38,55	-20,00	0,00	52,04
340	ADHEr, ASPT, FUM, LDH_D, THD2	12,75	0,13	12,54	0,00	-0,14	38,50	-20,00	0,00	51,99

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas f, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
341	ADHER, ME2, PFLi, PGL, THD2		12,69	0,38	17,31	0,00	19,01	0,00	-20,00	0,00	19,99
342	ADHER, G6PDHy, ME2, PFLi, THD2		12,69	0,38	17,31	0,00	19,01	0,00	-20,00	0,00	19,99
343	ADHER, ACKr, ACS, PPC, RPE		12,67	0,10	12,72	0,00	0,38	39,23	-20,00	0,00	52,69
344	ADHER, GLUDy, LDH_D, PPC, RPE		12,67	0,16	11,69	0,00	0,58	38,82	-20,00	0,00	51,63
345	ADHER, LDH_D, PPC, RPE, THD2		12,67	0,16	11,57	0,00	0,60	38,78	-20,00	0,00	51,52
346	ADHER, GLUDy, LDH_D, PPC, TAL		12,64	0,16	11,75	0,00	0,53	38,83	-20,00	0,00	51,71
347	ADHER, LDH_D, PPC, TAL, THD2		12,63	0,16	11,65	0,00	0,55	38,79	-20,00	0,00	51,61
348	ADHER, GLCpts, GLUDy, LDH_D, PPC		12,62	0,10	12,80	0,00	0,31	39,24	-20,00	0,00	52,79
349	ADHER, GLCpts, LDH_D, PPC, THD2		12,62	0,11	12,74	0,00	0,32	39,22	-20,00	0,00	52,73
350	ADHER, ACKr, GLUDy, LDH_D, PGI		12,38	0,13	12,45	0,00	9,92	10,79	-20,00	0,00	30,65
351	ADHER, ASPT, ATPS4r, GLCpts, MDH		12,20	0,20	10,35	0,00	18,28	0,00	-20,00	0,00	19,76
352	ADHER, LDH_D, PFLi, SUCD4, THD2		12,11	0,25	21,60	0,00	18,15	0,00	-20,00	0,00	23,35
353	ADHER, ACKr, AKGD, ATPS4r, PYK		12,05	0,24	12,18	0,00	12,02	25,48	-20,00	0,00	39,36
354	ADHER, ACKr, ATPS4r, PYK, SUCOAS		12,00	0,24	12,13	0,00	12,20	25,51	-20,00	0,00	39,36
355	ADHER, ATPS4r, EDA, GLUDy, PGI		11,98	0,13	19,29	0,00	7,97	19,98	-20,00	0,00	40,22
356	ADHER, EDA, GLCpts, GLUDy, PGI		11,98	0,14	19,25	0,00	7,98	19,96	-20,00	0,00	40,18
357	ADHER, ACKr, LDH_D, MDH, SUCD4		11,91	0,20	12,01	3,31	5,46	24,78	-20,00	0,00	41,50
358	ADHER, ACKr, GLUDy, NADH6, PYK		11,90	0,49	12,16	0,00	27,81	0,00	-20,00	0,00	15,63
359	ADHER, FUM, LDH_D, PFLi, THD2		11,76	0,39	19,51	0,00	17,62	0,00	-20,00	0,00	22,30
360	ADHER, LDH_D, MDH, PFLi, THD2		11,76	0,39	19,51	0,00	17,62	0,00	-20,00	0,00	22,30
361	ADHER, ACT6, ATPS4r, LDH_D, PPC		11,67	0,14	0,00	0,00	1,15	24,89	-19,46	0,00	38,65
362	ADHER, ACKr, LDH_D, PYRi2, SUCD4		11,66	0,21	11,78	0,00	8,63	21,96	-20,00	0,00	37,33
363	ADHER, ATPS4r, FUM, LDH_D, SUCD4		11,59	0,23	20,54	0,00	13,84	9,06	-20,00	0,00	31,25
364	ADHER, ATPS4r, LDH_D, MDH, SUCD4		11,59	0,23	20,54	0,00	13,84	9,06	-20,00	0,00	31,25
365	ADHER, ACKr, CBMK2, NADH6, PYK		11,52	0,55	11,82	0,00	27,24	0,00	-20,00	0,00	15,76
366	ADHER, ACKr, NADH6, PYK, RPE		11,50	0,56	11,81	0,00	27,22	0,00	-20,00	0,00	15,77
367	ADHER, ACKr, ASNS2, NADH6, PYK		11,50	0,56	11,80	0,00	27,21	0,00	-20,00	0,00	15,77
368	ADHER, ACKr, NADH6, PYK, TAL		11,49	0,56	11,80	0,00	27,20	0,00	-20,00	0,00	15,77
369	ADHER, ASPT, ATPS4r, FUM, LDH_D		11,46	0,30	8,96	0,00	8,56	25,90	-20,00	0,00	38,85
370	ADHER, ASPT, ATPS4r, LDH_D, MDH		11,43	0,34	17,13	0,00	8,27	17,71	-20,00	0,00	37,24
371	ADHER, MDH, PFLi, PYK, THD2		11,38	0,38	20,90	0,00	17,05	0,00	-20,00	0,00	23,58

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
372	ADHEr, FUM, PFLi, PYK, THD2		11,38	0,38	20,90	0,00	17,05	0,00	-20,00	0,00	23,58
373	ADHEr, ACKr, FUM, LDH_D, NADH6		11,25	0,53	11,54	0,00	23,26	0,00	-20,00	0,00	17,50
374	ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, LDH_D, SUCD4		11,24	0,27	20,72	0,00	13,49	8,70	-20,00	0,00	31,38
375	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, PGL, SUCD4		11,24	0,27	20,72	0,00	13,49	8,70	-20,00	0,00	31,38
376	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, PGDH, SUCD4		11,24	0,27	20,72	0,00	13,49	8,70	-20,00	0,00	31,38
377	ADHEr, GLYCL, PGL, PPC, THD2		11,24	0,14	2,95	0,00	3,54	28,60	-20,00	0,02	42,95
378	ADHEr, G6PDHy, GLYCL, PPC, THD2		11,24	0,14	2,95	0,00	3,54	28,60	-20,00	0,02	42,95
379	ADHEr, FTHFD, G6PDHy, PPC, THD2		11,22	0,14	2,94	0,00	3,54	28,55	-20,00	0,00	42,92
380	ADHEr, FTHFD, PGL, PPC, THD2		11,22	0,14	2,94	0,00	3,54	28,55	-20,00	0,00	42,92
381	ADHEr, MTHFC, PGL, PPC, THD2		11,22	0,14	2,94	0,00	3,54	28,55	-20,00	0,00	42,92
382	ADHEr, G6PDHy, MTHFC, PPC, THD2		11,22	0,14	2,94	0,00	3,54	28,55	-20,00	0,00	42,92
383	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, PFLi, SUCD4		11,20	0,32	22,07	0,00	17,78	0,00	-20,00	0,00	24,34
384	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4, TAL		11,18	0,28	20,84	0,00	13,41	8,69	-20,00	0,00	31,49
385	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, RPE, SUCD4		11,13	0,28	23,11	0,00	17,68	0,00	-20,00	0,00	25,09
386	ADHEr, ATPS4r, FUM, GLCpts, NADH6		11,13	0,27	19,49	0,00	16,68	0,00	-20,00	0,00	24,27
387	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, MDH, NADH6		11,13	0,27	19,49	0,00	16,68	0,00	-20,00	0,00	24,27
388	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, NADH6, PFLi		11,12	0,34	22,41	0,00	16,65	0,00	-20,00	0,00	24,82
389	ADHEr, ACKr, MALS, NADH12, NADH6		11,06	0,63	11,41	0,00	26,56	0,00	-20,00	0,00	15,92
390	ADHEr, ACKr, ICL, NADH12, NADH6		11,06	0,63	11,41	0,00	26,56	0,00	-20,00	0,00	15,92
391	ADHEr, ACKr, CBMK2, LDH_D, NADH6		11,06	0,64	11,40	0,00	26,54	0,00	-20,00	0,00	15,93
392	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, MDH, PFLi		11,04	0,35	22,48	0,00	16,54	0,00	-20,00	0,00	24,94
393	ADHEr, ATPS4r, FUM, GLCpts, PFLi		11,04	0,35	22,48	0,00	16,54	0,00	-20,00	0,00	24,94
394	ADHEr, ACKr, ASNS2, LDH_D, NADH6		11,03	0,64	11,38	0,00	26,51	0,00	-20,00	0,00	15,93
395	ADHEr, ACKr, ATPS4r, LDH_D, THD2		11,00	0,38	11,21	0,00	5,04	32,88	-20,00	0,00	46,77
396	ADHEr, GLCpts, GLUDy, PFLi, PGI		11,00	0,15	26,58	0,00	16,49	0,00	-20,00	0,00	27,66
397	ADHEr, GLCpts, GLUDy, PFK, PFLi		10,97	0,15	26,63	0,00	16,45	0,00	-20,00	0,00	27,73
398	ADHEr, FBA, GLCpts, GLUDy, PFLi		10,97	0,15	26,63	0,00	16,45	0,00	-20,00	0,00	27,73

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	GLC	GLY	H+
399	ADHEr, GLCpts, GLUDy, PFLi, TPI		10,97	0,15	26,63	0,00	16,45	0,00	-20,00	0,00	27,73
400	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PGI		10,97	0,11	27,23	0,00	15,95	0,99	-20,00	0,00	29,02
401	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, TPI		10,95	0,12	27,26	0,00	15,95	0,94	-20,00	0,00	29,02
402	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PFK		10,95	0,12	27,26	0,00	15,95	0,94	-20,00	0,00	29,02
403	ADHEr, ATPS4r, FBA, GLCpts, NADH6		10,95	0,12	27,26	0,00	15,95	0,94	-20,00	0,00	29,02
404	ADHEr, GLCpts, PFLi, RPE, TPI		10,94	0,17	26,35	0,00	16,40	0,00	-20,00	0,00	27,57
405	ADHEr, GLCpts, PFK, PFLi, RPE		10,94	0,17	26,35	0,00	16,40	0,00	-20,00	0,00	27,57
406	ADHEr, FBA, GLCpts, PFLi, RPE		10,94	0,17	26,35	0,00	16,40	0,00	-20,00	0,00	27,57
407	ADHEr, ATPS4r, NADH6, PFLi, PYK		10,93	0,28	24,13	0,00	16,38	0,00	-20,00	0,00	26,12
408	ADHEr, GLCpts, PFK, PFLi, TAL		10,93	0,17	26,37	0,00	16,38	0,00	-20,00	0,00	27,59
409	ADHEr, FBA, GLCpts, PFLi, TAL		10,93	0,17	26,37	0,00	16,38	0,00	-20,00	0,00	27,59
410	ADHEr, GLCpts, PFLi, TAL, TPI		10,93	0,17	26,37	0,00	16,38	0,00	-20,00	0,00	27,59
411	ADHEr, FBA, GLUDy, PFLi, RPE		10,92	0,18	26,25	0,00	16,37	0,00	-20,00	0,00	27,52
412	ADHEr, GLUDy, PFK, PFLi, RPE		10,92	0,18	26,25	0,00	16,37	0,00	-20,00	0,00	27,52
413	ADHEr, GLUDy, PFLi, RPE, TPI		10,92	0,18	26,25	0,00	16,37	0,00	-20,00	0,00	27,52
414	ADHEr, GLUDy, PFLi, TAL, TPI		10,91	0,18	26,27	0,00	16,35	0,00	-20,00	0,00	27,55
415	ADHEr, GLUDy, PFK, PFLi, TAL		10,91	0,18	26,27	0,00	16,35	0,00	-20,00	0,00	27,55
416	ADHEr, FBA, GLUDy, PFLi, TAL		10,91	0,18	26,27	0,00	16,35	0,00	-20,00	0,00	27,55
417	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, NADH6, SUCD4		10,79	0,32	21,77	0,00	14,53	5,29	-20,00	0,00	29,37
418	ADHEr, FUM, LDH_D, PFLi, SUCD4		10,76	0,23	25,74	0,00	16,13	0,00	-20,00	0,00	27,34
419	ADHEr, LDH_D, MDH, PFLi, SUCD4		10,76	0,23	25,74	0,00	16,13	0,00	-20,00	0,00	27,34

Tabla 6 (cont.)

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas t, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
1	ADHER		-0,90	0,00	-4,96	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
2	ADHER, PFLi		14,07	0,00	-4,31	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
3	ADHER, NADH6		2,51	0,00	-4,48	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
4	ADHER, THD2		0,13	0,00	-4,83	0,00	-0,60	0,00	-0,10	0,00	0,00
5	ADHER, PGI		-6,65	0,00	-2,62	0,00	-0,32	0,00	-0,05	0,00	0,00
6	ADHER, PFK		-6,68	0,00	-2,66	0,00	-0,33	0,00	-0,05	0,00	0,00
7	ADHER, FBA		-6,68	0,00	-2,66	0,00	-0,33	0,00	-0,05	0,00	0,00
8	ADHER, ATPS4r		1,88	0,00	-5,25	-2,00	-0,65	0,00	-0,11	0,00	0,00
9	ADHER, TPI		-6,68	0,00	-2,66	0,00	-0,33	0,00	-0,05	0,00	0,00
10	ADHER, SUCD4		-3,22	0,00	-4,04	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
11	ADHER, RPE		-0,76	0,00	-4,95	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
12	ADHER, GLCpts		-2,34	0,00	-4,39	0,00	-0,54	0,00	-0,09	0,00	0,00
13	ADHER, GLUDy		-2,13	0,00	-4,47	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
14	ADHER, TAL		-0,83	0,00	-4,95	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
15	ADHER, MDH		-1,66	0,00	-4,66	0,00	-0,58	0,00	-0,09	0,00	0,00
16	ADHER, FUM		-1,66	0,00	-4,66	0,00	-0,58	0,00	-0,09	0,00	0,00
17	ADHER, CBMK2		-1,01	0,00	-4,92	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
18	ADHER, HEX1, PGI		0,36	0,00	-1,93	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
19	ADHER, EDA, PGI		0,38	0,00	-1,94	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
20	ADHER, PFLi, PGI		9,09	0,00	-1,73	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
21	ADHER, FBA, PFLi		9,11	0,00	-1,75	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
22	ADHER, PFLi, TPI		9,11	0,00	-1,75	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
23	ADHER, PFK, PFLi		9,11	0,00	-1,75	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
24	ADHER, PFLi, THD2		14,16	0,00	-4,23	0,00	-0,52	0,00	-0,09	0,00	0,00
25	ADHER, GLCpts, PFLi		12,93	0,00	-3,72	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
26	ADHER, GLUDy, PFL		13,23	0,00	-3,87	0,00	-0,48	0,00	-0,08	0,00	0,00
27	ADHER, PFLi, RPE		14,08	0,00	-4,30	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
28	ADHER, PFLi, TAL		14,07	0,00	-4,30	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
29	ADHER, CBMK2, PFLi		13,99	0,00	-4,27	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
30	ADHER, ATPS4r, PGI		-3,19	0,00	-2,28	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas t, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
31	ADHEr, ATPS4r, NADH6		6,46	0,00	-4,15	0,00	-0,51	0,00	-0,08	0,00	0,00
32	ADHEr, ATPS4r, TPI		0,48	0,00	-2,25	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
33	ADHEr, ATPS4r, PFK		0,48	0,00	-2,25	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
34	ADHEr, ATPS4r, FBA		0,48	0,00	-2,25	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
35	ADHEr, NADH6, THD2		3,90	0,00	-4,30	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
36	ADHEr, ATPS4r, FUM		1,11	0,00	-4,22	0,00	-0,52	0,00	-0,09	0,00	0,00
37	ADHEr, ATPS4r, MDH		1,11	0,00	-4,22	0,00	-0,52	0,00	-0,09	0,00	0,00
38	ADHEr, NADH6, PGI		-3,12	0,00	-2,02	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
39	ADHEr, FUM, THD2		0,18	0,00	-4,28	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
40	ADHEr, MDH, THD2		0,18	0,00	-4,28	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
41	ADHEr, NADH6, PFK		-3,17	0,00	-2,06	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
42	ADHEr, FBA, NADH6		-3,17	0,00	-2,06	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
43	ADHEr, NADH6, TPI		-3,17	0,00	-2,06	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
44	ADHEr, GLCpts, NADH6		1,14	0,00	-3,90	0,00	-0,48	0,00	-0,08	0,00	0,00
45	ADHEr, NADH6, RPE		2,70	0,00	-4,46	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
46	ADHEr, GLUDy, NADH6		1,46	0,00	-4,03	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
47	ADHEr, FUM, NADH6		1,61	0,00	-4,10	0,00	-0,51	0,00	-0,08	0,00	0,00
48	ADHEr, MDH, NADH6		1,61	0,00	-4,10	0,00	-0,51	0,00	-0,08	0,00	0,00
49	ADHEr, NADH6, TAL		2,61	0,00	-4,47	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
50	ADHEr, GLCpts, THD2		-1,43	0,00	-4,27	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
51	ADHEr, GLUDy, THD2		-1,17	0,00	-4,36	0,00	-0,54	0,00	-0,09	0,00	0,00
52	ADHEr, PGI, SUCD4		-8,37	0,00	-1,95	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
53	ADHEr, GLCpts, PGI		-7,58	0,00	-2,25	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
54	ADHEr, HEX1, PFK		-8,47	0,00	-1,94	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
55	ADHEr, FBA, HEX1		-8,47	0,00	-1,94	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
56	ADHEr, HEX1, TPI		-8,47	0,00	-1,94	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
57	ADHEr, PFK, SUCD4		-8,37	0,00	-1,98	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
58	ADHEr, FBA, SUCD4		-8,37	0,00	-1,98	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
59	ADHEr, SUCD4, TPI		-8,37	0,00	-1,98	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
60	ADHEr, GLUDy, PGI		-7,35	0,00	-2,35	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
61	ADHEr, GLCpts, TPI		-7,61	0,00	-2,29	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas t, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
62	ADHER, GLCpts, PFK		-7,61	0,00	-2,29	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
63	ADHER, FBA, GLCpts		-7,61	0,00	-2,29	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
64	ADHER, PFK, RPE		-6,66	0,00	-2,63	0,00	-0,32	0,00	-0,05	0,00	0,00
65	ADHER, FBA, RPE		-6,66	0,00	-2,63	0,00	-0,32	0,00	-0,05	0,00	0,00
66	ADHER, RPE, TPI		-6,66	0,00	-2,63	0,00	-0,32	0,00	-0,05	0,00	0,00
67	ADHER, GLUDy, TPI		-7,38	0,00	-2,38	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
68	ADHER, FBA, GLUDy		-7,38	0,00	-2,38	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
69	ADHER, GLUDy, PFK		-7,38	0,00	-2,38	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
70	ADHER, TAL, TPI		-6,67	0,00	-2,64	0,00	-0,33	0,00	-0,05	0,00	0,00
71	ADHER, PFK, TAL		-6,67	0,00	-2,64	0,00	-0,33	0,00	-0,05	0,00	0,00
72	ADHER, FBA, TAL		-6,67	0,00	-2,64	0,00	-0,33	0,00	-0,05	0,00	0,00
73	ADHER, ATPS4r, GLUDy		0,48	0,00	-4,75	-2,00	-0,59	0,00	-0,10	0,00	0,00
74	ADHER, PYK, SUCD4		-5,01	0,00	-3,32	0,00	-0,41	0,00	-0,07	0,00	0,00
75	ADHER, GLCpts, SUCD4		-4,70	0,00	-3,45	0,00	-0,43	0,00	-0,07	0,00	0,00
76	ADHER, RPE, SUCD4		-3,14	0,00	-4,01	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
77	ADHER, FUM, GLUDy		-4,29	0,00	-3,61	0,00	-0,45	0,00	-0,07	0,00	0,00
78	ADHER, GLUDy, MDH		-4,29	0,00	-3,61	0,00	-0,45	0,00	-0,07	0,00	0,00
79	ADHER, GLUDy, SUCD4		-4,24	0,00	-3,63	0,00	-0,45	0,00	-0,07	0,00	0,00
80	ADHER, SUCD4, TAL		-3,18	0,00	-4,02	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
81	ADHER, GLCpts, RPE		-2,22	0,00	-4,37	0,00	-0,54	0,00	-0,09	0,00	0,00
82	ADHER, GLCpts, GLUDy		-3,42	0,00	-3,96	0,00	-0,49	0,00	-0,08	0,00	0,00
83	ADHER, GLCpts, MDH		-3,12	0,00	-4,08	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
84	ADHER, FUM, GLCpts		-3,12	0,00	-4,08	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
85	ADHER, GLUDy, RPE		-2,00	0,00	-4,46	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
86	ADHER, GLCpts, TAL		-2,28	0,00	-4,38	0,00	-0,54	0,00	-0,09	0,00	0,00
87	ADHER, FUM, RPE		-1,54	0,00	-4,64	0,00	-0,57	0,00	-0,09	0,00	0,00
88	ADHER, MDH, RPE		-1,54	0,00	-4,64	0,00	-0,57	0,00	-0,09	0,00	0,00
89	ADHER, MDH, PYK		-3,17	0,00	-4,03	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,09	0,00
90	ADHER, FUM, PYK		-3,17	0,00	-4,03	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,09	0,00
91	ADHER, MDH, TAL		-1,60	0,00	-4,65	0,00	-0,58	0,00	-0,09	0,00	0,00
92	ADHER, FUM, TAL		-1,60	0,00	-4,65	0,00	-0,58	0,00	-0,09	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
93	ADHER, GLUDy, TAL		-2,06	0,00	-4,47	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
94	ADHER, CBMK2, GLU5K		-1,05	0,00	-4,90	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
95	ADHER, CBMK2, G5SD		-1,05	0,00	-4,90	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
96	ADHER, ASNS2, CBMK2		-1,05	0,00	-4,90	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
97	ADHER, CBMK2, SO4I2		-1,03	0,00	-4,91	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
98	ADHER, CBMK2, HEX1		-1,01	0,00	-4,92	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
99	ADHER, ADA, PFLi, PGI		10,28	0,00	-1,38	0,00	-0,17	0,00	-0,03	0,00	0,00
100	ADHER, ADA, NADH6, PGI		9,91	0,00	-1,11	-2,00	-0,14	0,00	-0,02	0,00	0,00
101	ADHER, FRD2, GLUDy, LDH_D		-10,70	0,00	-1,05	0,00	-0,13	0,00	-0,02	0,00	0,00
102	ADHER, FRD2, LDH_D, THD2		-10,60	0,00	-1,09	0,00	-0,13	0,00	-0,02	0,00	0,00
103	ADHER, ACKr, ACS, PPC		-10,25	0,00	-0,96	-2,00	-0,12	0,00	-0,02	0,00	0,00
104	ADHER, GLUDy, LDH_D, PPC		-9,20	0,00	-1,38	-2,00	-0,17	0,00	-0,03	0,00	0,00
105	ADHER, LDH_D, PPC, THD2		-9,09	0,00	-1,43	-2,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
106	ADHER, ATPS4r, ADA, PGI		-1,21	0,00	-1,30	0,00	-0,16	0,00	-0,03	0,00	0,00
107	ADHER, ADA, GLCpts, PGI		-1,16	0,00	-1,32	0,00	-0,16	0,00	-0,03	0,00	0,00
108	ADHER, ADA, GLUDy, PGI		-0,12	0,00	-1,73	0,00	-0,21	0,00	-0,04	0,00	0,00
109	ADHER, GLUDy, HEX1, PGI		-0,13	0,00	-1,74	0,00	-0,21	0,00	-0,04	0,00	0,00
110	ADHER, ATPS4r, FRD2, LDH_D		5,32	0,00	-4,64	-5,00	-0,30	0,00	-0,05	0,00	2,22
111	ADHER, ACKr, NADH6, PYK		25,99	0,00	-4,86	-20,00	-0,60	0,00	-0,10	0,00	0,00
112	ADHER, ACKr, LDH_D, NADH6		27,24	0,00	-5,56	-20,00	-0,69	0,00	-0,11	0,00	0,00
113	ADHER, GLCpts, PFLi, PGI		8,60	0,00	-1,48	0,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
114	ADHER, GLUDy, PFLi, PGI		8,73	0,00	-1,55	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
115	ADHER, FBA, GLCpts, PFLi		8,62	0,00	-1,50	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
116	ADHER, GLCpts, PFK, PFLi		8,62	0,00	-1,50	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
117	ADHER, GLCpts, PFLi, TPI		8,62	0,00	-1,50	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
118	ADHER, FBA, GLUDy, PFLi		8,75	0,00	-1,56	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
119	ADHER, GLUDy, PFK, PFLi		8,75	0,00	-1,56	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
120	ADHER, GLUDy, PFLi, TPI		8,75	0,00	-1,56	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
121	ADHER, FBA, PFLi, RPE		9,09	0,00	-1,74	0,00	-0,21	0,00	-0,04	0,00	0,00
122	ADHER, PFLi, RPE, TPI		9,09	0,00	-1,74	0,00	-0,21	0,00	-0,04	0,00	0,00
123	ADHER, PFK, PFLi, RPE		9,09	0,00	-1,74	0,00	-0,21	0,00	-0,04	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
124	ADHER, PFK, PFLi, TAL	9,10	0,00	-1,74	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
125	ADHER, PFLi, TAL, TPI	9,10	0,00	-1,74	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
126	ADHER, FBA, PFLi, TAL	9,10	0,00	-1,74	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
127	ADHER, ATPS4r, NADH6, PGI	1,46	0,00	-1,48	0,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
128	ADHER, GLCpts, PFLi, THD2	13,01	0,00	-3,65	0,00	-0,45	0,00	-0,07	0,00	0,00
129	ADHER, GLUDy, PFLi, THD2	13,33	0,00	-3,81	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
130	ADHER, LDH_D, PFLi, SUCD4	10,77	0,00	-2,61	0,00	-0,32	0,00	-0,05	0,00	0,00
131	ADHER, LDH_D, NADH6, PFLi	12,01	0,00	-3,25	0,00	-0,40	0,00	-0,07	0,00	0,00
132	ADHER, ATPS4r, LDH_D, SUCD4	8,53	0,00	-3,04	-2,00	-0,38	0,00	-0,06	0,00	0,00
133	ADHER, FUM, PFLi, PYK	12,15	0,00	-3,32	0,00	-0,41	0,00	-0,07	0,00	0,00
134	ADHER, MDH, PFLi, PYK	12,15	0,00	-3,32	0,00	-0,41	0,00	-0,07	0,00	0,00
135	ADHER, GLCpts, GLUDy, PFLi	12,20	0,00	-3,35	0,00	-0,41	0,00	-0,07	0,00	0,00
136	ADHER, GLCpts, PFLi, RPE	12,94	0,00	-3,71	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
137	ADHER, GLCpts, PFLi, TAL	12,93	0,00	-3,72	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
138	ADHER, GLUDy, PFLi, RPE	13,24	0,00	-3,87	0,00	-0,48	0,00	-0,08	0,00	0,00
139	ADHER, CBMK2, GLCpts, PFLi	12,87	0,00	-3,69	0,00	-0,46	0,00	-0,07	0,00	0,00
140	ADHER, LDH_D, MDH, PFLi	12,95	0,00	-3,73	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
141	ADHER, FUM, LDH_D, PFLi	12,95	0,00	-3,73	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
142	ADHER, GLUDy, PFLi, TAL	13,23	0,00	-3,87	0,00	-0,48	0,00	-0,08	0,00	0,00
143	ADHER, CBMK2, GLUDy, PFLi	13,17	0,00	-3,84	0,00	-0,48	0,00	-0,08	0,00	0,00
144	ADHER, CBMK2, PFLi, RPE	14,01	0,00	-4,26	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
145	ADHER, CBMK2, PFLi, TAL	14,00	0,00	-4,26	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
146	ADHER, ASNS2, G5SD, PFLi	14,01	0,00	-4,28	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
147	ADHER, ASNS2, GLU5K, PFLi	14,01	0,00	-4,28	0,00	-0,53	0,00	-0,09	0,00	0,00
148	ADHER, ATPS4r, GLCpts, MDH	5,89	0,00	-3,22	0,00	-0,40	0,00	-0,07	0,00	0,00
149	ADHER, ATPS4r, FUM, GLCpts	5,89	0,00	-3,22	0,00	-0,40	0,00	-0,07	0,00	0,00
150	ADHER, ATPS4r, FBA, NADH6	4,45	0,00	-1,50	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
151	ADHER, ATPS4r, NADH6, TPI	4,45	0,00	-1,50	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
152	ADHER, ATPS4r, NADH6, PFK	4,45	0,00	-1,50	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
153	ADHER, ATPS4r, FUM, PGL	11,87	0,00	-3,80	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
154	ADHER, ATPS4r, MDH, PGDH	11,87	0,00	-3,80	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
155	ADHEr, ATPS4r, FUM, G6PDHy		11,87	0,00	-3,80	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
156	ADHEr, ATPS4r, FUM, PGDH		11,87	0,00	-3,80	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
157	ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL		11,87	0,00	-3,80	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
158	ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH		11,87	0,00	-3,80	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
159	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, PPC		-0,41	0,00	-3,83	-10,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,02
160	ADHEr, ATPS4r, FUM, TAL		11,60	0,00	-3,81	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
161	ADHEr, ATPS4r, MDH, TAL		11,60	0,00	-3,81	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
162	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6		11,59	0,00	-3,65	-2,00	-0,45	0,00	-0,07	0,00	0,00
163	ADHEr, ATPS4r, MDH, RPE		11,34	0,00	-3,82	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
164	ADHEr, ATPS4r, FUM, RPE		11,34	0,00	-3,82	0,00	-0,47	0,00	-0,08	0,00	0,00
165	ADHEr, ATPS4r, NADH6, PGDH		10,80	0,00	-4,00	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
166	ADHEr, ATPS4r, NADH6, PGL		10,80	0,00	-4,00	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
167	ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, NADH6		10,80	0,00	-4,00	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
168	ADHEr, ATPS4r, NADH6, TAL		10,51	0,00	-4,01	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
169	ADHEr, ATPS4r, NADH6, RPE		10,25	0,00	-4,02	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
170	ADHEr, G6PDHy, ME2, THD2		-0,86	0,00	-3,72	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
171	ADHEr, ME2, PGL, THD2		-0,86	0,00	-3,72	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
172	ADHEr, G6PDHy, PPC, THD2		6,22	8,06	-4,07	-20,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
173	ADHEr, PGL, PPC, THD2		6,22	8,06	-4,07	-20,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
174	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, NADH6		5,40	0,00	-3,75	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
175	ADHEr, ACKr, FRD2, LDH_D		15,97	0,00	-6,24	-15,00	-0,69	2,92	-0,11	0,00	0,68
176	ADHEr, ATPS4r, FBA, RPE		0,40	0,00	-2,23	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
177	ADHEr, ATPS4r, RPE, TPI		0,40	0,00	-2,23	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
178	ADHEr, ATPS4r, PFK, RPE		0,40	0,00	-2,23	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
179	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, PFK		-0,22	0,00	-2,02	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
180	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, TPI		-0,22	0,00	-2,02	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
181	ADHEr, ATPS4r, FBA, GLUDy		-0,22	0,00	-2,02	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
182	ADHEr, ATPS4r, PFK, TAL		0,44	0,00	-2,24	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
183	ADHEr, ATPS4r, TAL, TPI		0,44	0,00	-2,24	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
184	ADHEr, ATPS4r, FBA, TAL		0,44	0,00	-2,24	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
185	ADHEr, ASPT, MDH, PYK		-7,34	0,00	-2,39	0,00	-0,30	0,00	-0,05	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas f, t, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
186	ADHER, MDH, PGL, THD2		12,12	0,00	-6,14	-15,00	-0,76	0,00	-0,12	0,00	0,00
187	ADHER, G6PDHy, MDH, THD2		12,12	0,00	-6,14	-15,00	-0,76	0,00	-0,12	0,00	0,00
188	ADHER, GLCpts, NADH6, THD2		2,35	0,00	-3,74	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
189	ADHER, GLUDy, NADH6, THD2		2,75	0,00	-3,88	0,00	-0,48	0,00	-0,08	0,00	0,00
190	ADHER, ASPT, LDH_D, MDH		-3,60	0,00	-3,89	0,00	-0,48	0,00	-0,08	0,00	0,00
191	ADHER, GLCpts, NADH6, PGI		-3,94	0,00	-1,68	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
192	ADHER, LDH_D, SUCD4, THD2		-1,90	0,00	-3,49	0,00	-0,43	0,00	-0,07	0,00	0,00
193	ADHER, GLUDy, NADH6, PGI		-3,63	0,00	-1,81	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
194	ADHER, ACKr, FUM, LDH_D		13,82	0,00	-2,77	0,00	-0,34	17,80	-0,06	0,00	0,00
195	ADHER, FBA, GLCpts, NADH6		-3,99	0,00	-1,71	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
196	ADHER, GLCpts, NADH6, TPI		-3,99	0,00	-1,71	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
197	ADHER, ACKr, LDH_D, MDH		13,82	0,00	-2,77	0,00	-0,34	17,80	-0,06	0,00	0,00
198	ADHER, GLCpts, NADH6, PFK		-3,99	0,00	-1,71	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
199	ADHER, GLCpts, MDH, THD2		-1,38	0,00	-3,71	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
200	ADHER, FUM, GLCpts, THD2		-1,38	0,00	-3,71	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
201	ADHER, NADH6, PFK, RPE		-3,13	0,00	-2,03	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
202	ADHER, FBA, NADH6, RPE		-3,13	0,00	-2,03	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
203	ADHER, NADH6, RPE, TPI		-3,13	0,00	-2,03	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
204	ADHER, GLUDy, NADH6, TPI		-3,69	0,00	-1,84	0,00	-0,23	0,00	-0,04	0,00	0,00
205	ADHER, GLUDy, NADH6, PFK		-3,69	0,00	-1,84	0,00	-0,23	0,00	-0,04	0,00	0,00
206	ADHER, FBA, GLUDy, NADH6		-3,69	0,00	-1,84	0,00	-0,23	0,00	-0,04	0,00	0,00
207	ADHER, NADH6, PFK, TAL		-3,15	0,00	-2,04	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
208	ADHER, FBA, NADH6, TAL		-3,15	0,00	-2,04	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
209	ADHER, NADH6, TAL, TPI		-3,15	0,00	-2,04	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
210	ADHER, ACKr, AKGD, ATPS4r		55,34	0,00	-4,99	-82,37	-0,62	0,00	-0,10	0,00	0,00
211	ADHER, GLCpts, NADH6, RPE		1,30	0,00	-3,88	0,00	-0,48	0,00	-0,08	0,00	0,00
212	ADHER, FUM, GLCpts, NADH6		0,21	0,00	-3,50	0,00	-0,43	0,00	-0,07	0,00	0,00
213	ADHER, GLCpts, MDH, NADH6		0,21	0,00	-3,50	0,00	-0,43	0,00	-0,07	0,00	0,00
214	ADHER, GLCpts, GLUDy, NADH6		0,22	0,00	-3,51	0,00	-0,43	0,00	-0,07	0,00	0,00
215	ADHER, FUM, NADH6, PYK		0,23	0,00	-3,51	0,00	-0,43	0,00	-0,07	0,00	0,00
216	ADHER, MDH, NADH6, PYK		0,23	0,00	-3,51	0,00	-0,43	0,00	-0,07	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas t, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
217	ADHER, ACKr, ATPS4r, SUCCOAS		20,07	0,00	-5,03	-47,55	-0,62	0,00	-0,10	0,00	0,00
218	ADHER, GLUDy, NADH6, RPE		1,63	0,00	-4,01	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
219	ADHER, MDH, NADH6, RPE		1,76	0,00	-4,07	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
220	ADHER, FUM, NADH6, RPE		1,76	0,00	-4,07	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
221	ADHER, GLQpts, NADH6, TAL		1,23	0,00	-3,89	0,00	-0,48	0,00	-0,08	0,00	0,00
222	ADHER, GLUDy, NADH6, TAL		1,55	0,00	-4,02	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
223	ADHER, FUM, NADH6, TAL		1,69	0,00	-4,08	0,00	-0,51	0,00	-0,08	0,00	0,00
224	ADHER, MDH, NADH6, TAL		1,69	0,00	-4,08	0,00	-0,51	0,00	-0,08	0,00	0,00
225	ADHER, CBMK2, GLU5K, NADH6		2,38	0,00	-4,43	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
226	ADHER, CBMK2, G5SD, NADH6		2,38	0,00	-4,43	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
227	ADHER, CBMK2, NADH6, SO4t2		2,40	0,00	-4,44	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
228	ADHER, ASNS2, CBMK2, NADH6		2,38	0,00	-4,43	0,00	-0,55	0,00	-0,09	0,00	0,00
229	ADHER, ATPS4r, PYK, SUCD4		6,92	7,87	-3,12	-2,00	-0,39	0,00	-0,06	0,00	0,00
230	ADHER, GLQpts, PGI, SUCD4		-9,35	0,00	-1,56	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
231	ADHER, FUM, GLUDy, PGI		-9,07	0,00	-1,67	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
232	ADHER, GLUDy, MDH, PGI		-9,07	0,00	-1,67	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
233	ADHER, GLUDy, PGI, SUCD4		-8,89	0,00	-1,74	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
234	ADHER, GLQpts, SUCD4, TPI		-9,35	0,00	-1,59	0,00	-0,20	0,00	-0,03	0,00	0,00
235	ADHER, GLQpts, PFK, SUCD4		-9,35	0,00	-1,59	0,00	-0,20	0,00	-0,03	0,00	0,00
236	ADHER, FBA, GLQpts, SUCD4		-9,35	0,00	-1,59	0,00	-0,20	0,00	-0,03	0,00	0,00
237	ADHER, HEX1, RPE, TPI ADHER,		-8,46	0,00	-1,92	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
238	ADHER, FBA, HEX1, RPE		-8,46	0,00	-1,92	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
239	ADHER, HEX1, PFK, RPE		-8,46	0,00	-1,92	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
240	ADHER, FUM, GLUDy, TPI		-9,08	0,00	-1,70	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
241	ADHER, FBA, GLUDy, MDH		-9,08	0,00	-1,70	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
242	ADHER, FUM, GLUDy, PFK		-9,08	0,00	-1,70	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
243	ADHER, GLUDy, MDH, PFK		-9,08	0,00	-1,70	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
244	ADHER, GLUDy, MDH, TPI		-9,08	0,00	-1,70	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
245	ADHER, FBA, FUM, GLUDy		-9,08	0,00	-1,70	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
246	ADHER, GLQpts, GLUDy, PGI		-8,19	0,00	-2,02	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
247	ADHER, RPE, SUCD4, TPI		-8,37	0,00	-1,95	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
248	ADHER, FBA, RPE, SUCD4		-8,37	0,00	-1,95	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
249	ADHER, PFK, RPE, SUCD4		-8,37	0,00	-1,95	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
250	ADHER, GLUDy, HEX1, PFK		-8,96	0,00	-1,75	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
251	ADHER, GLUDy, HEX1, TPI		-8,96	0,00	-1,75	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
252	ADHER, FBA, GLUDy, HEX1		-8,96	0,00	-1,75	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
253	ADHER, FBA, GLUDy, SUCD4		-8,90	0,00	-1,77	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
254	ADHER, GLUDy, SUCD4, TPI		-8,90	0,00	-1,77	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
255	ADHER, GLUDy, PFK, SUCD4		-8,90	0,00	-1,77	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	0,00
256	ADHER, FBA, HEX1, TAL		-8,47	0,00	-1,93	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
257	ADHER, HEX1, PFK, TAL		-8,47	0,00	-1,93	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
258	ADHER, HEX1, TAL, TPI		-8,47	0,00	-1,93	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
259	ADHER, PFK, SUCD4, TAL		-8,37	0,00	-1,97	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
260	ADHER, SUCD4, TAL, TPI		-8,37	0,00	-1,97	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
261	ADHER, FBA, SUCD4, TAL		-8,37	0,00	-1,97	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
262	ADHER, ACKr, LDH_D, SUCD4		15,34	0,00	-1,92	0,00	-0,24	23,88	-0,04	0,00	0,00
263	ADHER, GLCpts, RPE, TPI		-7,59	0,00	-2,26	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
264	ADHER, GLCpts, PFK, RPE		-7,59	0,00	-2,26	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
265	ADHER, FBA, GLCpts, RPE		-7,59	0,00	-2,26	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
266	ADHER, ACT6, LDH_D, MDH		21,84	0,00	-2,02	0,00	-0,25	30,11	-0,04	0,00	0,00
267	ADHER, GLCpts, GLUDy, TPI		-8,22	0,00	-2,04	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
268	ADHER, ACT6, FUM, LDH_D		21,84	0,00	-2,02	0,00	-0,25	30,11	-0,04	0,00	0,00
269	ADHER, FBA, GLCpts, GLUDy		-8,22	0,00	-2,04	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
270	ADHER, GLCpts, GLUDy, PFK		-8,22	0,00	-2,04	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
271	ADHER, GLUDy, RPE, TPI		-7,35	0,00	-2,35	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
272	ADHER, FBA, GLUDy, RPE		-7,35	0,00	-2,35	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
273	ADHER, GLUDy, PFK, RPE		-7,35	0,00	-2,35	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
274	ADHER, GLCpts, TAL, TPI		-7,60	0,00	-2,27	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
275	ADHER, FBA, GLCpts, TAL		-7,60	0,00	-2,27	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
276	ADHER, GLCpts, PFK, TAL		-7,60	0,00	-2,27	0,00	-0,28	0,00	-0,05	0,00	0,00
277	ADHER, GLUDy, PFK, TAL		-7,36	0,00	-2,36	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
278	ADHER, FBA, GLUDy, TAL		-7,36	0,00	-2,36	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡ #	metabólicas	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
279	ADHEr, GLUDy, TAL, TPI		-7,36	0,00	-2,36	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
280	ADHEr, GLUDy, MDH, PYK		-6,12	0,00	-2,88	0,00	-0,36	0,00	-0,06	0,00	0,00
281	ADHEr, FUM, GLUDy, PYK		-6,12	0,00	-2,88	0,00	-0,36	0,00	-0,06	0,00	0,00
282	ADHEr, PYK, RPE, SUCD4		-4,99	0,00	-3,28	0,00	-0,41	0,00	-0,07	0,00	0,00
283	ADHEr, GLUDy, PYK, SUCD4		-5,98	0,00	-2,94	0,00	-0,36	0,00	-0,06	0,00	0,00
284	ADHEr, MDH, PYK, SUCD4		-5,76	0,00	-3,02	0,00	-0,37	0,00	-0,06	0,00	0,00
285	ADHEr, FUM, PYK, SUCD4		-5,76	0,00	-3,02	0,00	-0,37	0,00	-0,06	0,00	0,00
286	ADHEr, GLQpts, RPE, SUCD4		-4,64	0,00	-3,42	0,00	-0,42	0,00	-0,07	0,00	0,00
287	ADHEr, GLQpts, GLUDy, MDH		-5,65	0,00	-3,07	0,00	-0,38	0,00	-0,06	0,00	0,00
288	ADHEr, FUM, GLQpts, GLUDy		-5,65	0,00	-3,07	0,00	-0,38	0,00	-0,06	0,00	0,00
289	ADHEr, GLQpts, GLUDy, SUCD4		-5,58	0,00	-3,10	0,00	-0,38	0,00	-0,06	0,00	0,00
290	ADHEr, PYK, SUCD4, TAL		-5,00	0,00	-3,30	0,00	-0,41	0,00	-0,07	0,00	0,00
291	ADHEr, GLUDy, MDH, RPE		-4,23	0,00	-3,58	0,00	-0,44	0,00	-0,07	0,00	0,00
292	ADHEr, FUM, GLUDy, RPE		-4,23	0,00	-3,58	0,00	-0,44	0,00	-0,07	0,00	0,00
293	ADHEr, GLUDy, RPE, SUCD4		-4,17	0,00	-3,60	0,00	-0,45	0,00	-0,07	0,00	0,00
294	ADHEr, GLQpts, SUCD4, TAL		-4,67	0,00	-3,43	0,00	-0,42	0,00	-0,07	0,00	0,00
295	ADHEr, GLUDy, MDH, TAL		-4,26	0,00	-3,60	0,00	-0,44	0,00	-0,07	0,00	0,00
296	ADHEr, FUM, GLUDy, TAL		-4,26	0,00	-3,60	0,00	-0,44	0,00	-0,07	0,00	0,00
297	ADHEr, GLUDy, SUCD4, TAL		-4,21	0,00	-3,62	0,00	-0,45	0,00	-0,07	0,00	0,00
298	ADHEr, GLQpts, GLUDy, RPE		-3,31	0,00	-3,94	0,00	-0,49	0,00	-0,08	0,00	0,00
299	ADHEr, FUM, GLQpts, RPE		-3,02	0,00	-4,06	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
300	ADHEr, GLQpts, MDH, RPE		-3,02	0,00	-4,06	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
301	ADHEr, FUM, LDH_D, SUCD4		-4,04	0,00	-3,71	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
302	ADHEr, LDH_D, MDH, SUCD4		-4,04	0,00	-3,71	0,00	-0,46	0,00	-0,08	0,00	0,00
303	ADHEr, GLQpts, GLUDy, TAL		-3,36	0,00	-3,95	0,00	-0,49	0,00	-0,08	0,00	0,00
304	ADHEr, FUM, GLQpts, TAL		-3,07	0,00	-4,07	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
305	ADHEr, GLQpts, MDH, TAL		-3,07	0,00	-4,07	0,00	-0,50	0,00	-0,08	0,00	0,00
306	ADHEr, CBMK2, GLU5K, SUCD4		-3,34	0,00	-3,99	0,00	-0,49	0,00	-0,08	0,00	0,00
307	ADHEr, CBMK2, G5SD, SUCD4		-3,34	0,00	-3,99	0,00	-0,49	0,00	-0,08	0,00	0,00
308	ADHEr, CBMK2, GLU5K, RPE		-0,91	0,00	-4,89	0,00	-0,60	0,00	-0,10	0,00	0,00
309	ADHEr, CBMK2, G5SD, RPE		-0,91	0,00	-4,89	0,00	-0,60	0,00	-0,10	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas t, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
310	ADHER, CBMK2, GLCpts, GLU5K		-2,47	0,00	-4,34	0,00	-0,54	0,00	-0,09	0,00	0,00
311	ADHER, ASNS2, CBMK2, RPE		-0,91	0,00	-4,89	0,00	-0,60	0,00	-0,10	0,00	0,00
312	ADHER, CBMK2, G5SD, GLCpts		-2,47	0,00	-4,34	0,00	-0,54	0,00	-0,09	0,00	0,00
313	ADHER, ASNS2, CBMK2, GLCpts		-2,47	0,00	-4,34	0,00	-0,54	0,00	-0,09	0,00	0,00
314	ADHER, CBMK2, GLU5K, TAL		-0,98	0,00	-4,89	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
315	ADHER, CBMK2, G5SD, TAL		-0,98	0,00	-4,89	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
316	ADHER, ASNS2, CBMK2, TAL		-0,98	0,00	-4,90	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
317	ADHER, CBMK2, GLU5K, MDH		-1,80	0,00	-4,61	0,00	-0,57	0,00	-0,09	0,00	0,00
318	ADHER, CBMK2, FUM, G5SD		-1,80	0,00	-4,61	0,00	-0,57	0,00	-0,09	0,00	0,00
319	ADHER, CBMK2, G5SD, MDH		-1,80	0,00	-4,61	0,00	-0,57	0,00	-0,09	0,00	0,00
320	ADHER, CBMK2, FUM, GLU5K		-1,80	0,00	-4,61	0,00	-0,57	0,00	-0,09	0,00	0,00
321	ADHER, ASNS2, CBMK2, MDH		-1,80	0,00	-4,61	0,00	-0,57	0,00	-0,09	0,00	0,00
322	ADHER, ASNS2, CBMK2, FUM		-1,80	0,00	-4,61	0,00	-0,57	0,00	-0,09	0,00	0,00
323	ADHER, ASNS2, GLU5K, SO4t2		-1,01	0,00	-4,92	0,00	-0,61	0,00	-0,10	0,00	0,00
324	ADHER, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi		11,71	0,00	-2,00	0,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
325	ADHER, ADA, GLUDy, PFLi, PGI		10,00	0,00	-1,23	0,00	-0,15	0,00	-0,02	0,00	0,00
326	ADHER, ATPS4r, G6PDHy, GLCpts, MDH		10,67	0,00	-1,59	0,00	-0,20	0,00	-0,03	0,00	0,00
327	ADHER, ATPS4r, GLCpts, MDH, PGL		10,67	0,00	-1,59	0,00	-0,20	0,00	-0,03	0,00	0,00
328	ADHER, ADA, GLUDy, NADH6, PGI		9,64	0,00	-0,99	-2,00	-0,12	0,00	-0,02	0,00	0,00
329	ADHER, G6PDHy, LDH_D, PPC, THD2		-10,49	0,00	-0,87	-2,00	-0,11	0,00	-0,02	0,00	0,00
330	ADHER, LDH_D, PGL, PPC, THD2		-10,49	0,00	-0,87	-2,00	-0,11	0,00	-0,02	0,00	0,00
331	ADHER, ATPS4r, FRD2, LDH_D, NADH6		9,33	0,00	-7,86	-5,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
332	ADHER, ADA, LDH_D, PPC, THD2		-8,88	0,00	-1,36	-2,00	-0,17	0,00	-0,03	0,00	0,00
333	ADHER, FRD2, GLUDy, LDH_D, RPE		-10,71	0,00	-1,03	0,00	-0,13	0,00	-0,02	0,00	0,00
334	ADHER, FRD2, LDH_D, RPE, THD2		-10,58	0,00	-1,08	0,00	-0,13	0,00	-0,02	0,00	0,00
335	ADHER, FRD2, GLUDy, LDH_D, THD2		-10,88	0,00	-0,98	0,00	-0,12	0,00	-0,02	0,00	0,00
336	ADHER, FRD2, GLUDy, LDH_D, TAL		-10,71	0,00	-1,04	0,00	-0,13	0,00	-0,02	0,00	0,00
337	ADHER, FRD2, LDH_D, TAL, THD2		-10,59	0,00	-1,09	0,00	-0,13	0,00	-0,02	0,00	0,00
338	ADHER, ATPS4r, LDH_D, NADH6		1,95	0,00	-2,42	-10,00	-0,30	0,00	-0,05	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas f, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
	PPC										
339	ADHEr, ASPT, FUM, GLUDy, LDH_D		-10,53	0,00	-1,12	0,00	-0,14	0,00	-0,02	0,00	0,00
340	ADHEr, ASPT, FUM, LDH_D, THD2		-10,42	0,00	-1,16	0,00	-0,14	0,00	-0,02	0,00	0,00
341	ADHEr, ME2, PFLi, PGL, THD2		13,21	0,00	-3,25	0,00	-0,40	0,00	-0,07	0,00	0,00
342	ADHEr, G6PDHy, ME2, PFLi, THD2		13,21	0,00	-3,25	0,00	-0,40	0,00	-0,07	0,00	0,00
343	ADHEr, ACKr, ACS, PPC, RPE		-10,40	0,00	-0,89	-2,00	-0,11	0,00	-0,02	0,00	0,00
344	ADHEr, GLUDy, LDH_D, PPC, RPE		-9,20	0,00	-1,37	-2,00	-0,17	0,00	-0,03	0,00	0,00
345	ADHEr, LDH_D, PPC, RPE, THD2		-9,06	0,00	-1,42	-2,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
346	ADHEr, GLUDy, LDH_D, PPC, TAL		-9,20	0,00	-1,37	-2,00	-0,17	0,00	-0,03	0,00	0,00
347	ADHEr, LDH_D, PPC, TAL, THD2		-9,08	0,00	-1,42	-2,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
348	ADHEr, GLCpts, GLUDy, LDH_D, PPC		-10,40	0,00	-0,91	-2,00	-0,11	0,00	-0,02	0,00	0,00
349	ADHEr, GLCpts, LDH_D, PPC, THD2		-10,32	0,00	-0,93	-2,00	-0,12	0,00	-0,02	0,00	0,00
350	ADHEr, ACKr, GLUDy, LDH_D, PGI		6,43	0,00	-1,13	0,00	-0,14	6,48	-0,02	0,00	0,00
351	ADHEr, ASPT, ATPS4r, GLCpts, MDH		9,70	8,01	-1,71	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
352	ADHEr, LDH_D, PFLi, SUCD4, THD2		10,54	0,00	-2,12	0,00	-0,26	0,00	-0,04	0,00	0,00
353	ADHEr, ACKr, AKGD, ATPS4r, PYK		4,35	0,00	-2,07	-13,40	-0,26	0,00	-0,04	0,00	0,00
354	ADHEr, ACKr, ATPS4r, PYK, SUCOAS		4,62	0,00	-2,09	-13,93	-0,26	0,00	-0,04	0,00	0,00
355	ADHEr, ATPS4r, EDA, GLUDy, PGI		-1,56	0,00	-1,15	0,00	-0,14	0,00	-0,02	0,00	0,00
356	ADHEr, EDA, GLCpts, GLUDy, PGI		-1,51	0,00	-1,18	0,00	-0,15	0,00	-0,02	0,00	0,00
357	ADHEr, ACKr, LDH_D, MDH, SUCD4		0,47	0,00	-5,01	0,00	-0,21	0,00	-0,03	0,00	0,00
358	ADHEr, ACKr, GLUDy, NADH6, PYK		24,87	0,00	-4,23	-20,00	-0,52	0,00	-0,09	0,00	0,00
359	ADHEr, FUM, LDH_D, PFLi, THD2		13,05	0,00	-3,40	0,00	-0,42	0,00	-0,07	0,00	0,00
360	ADHEr, LDH_D, MDH, PFLi, THD2		13,05	0,00	-3,40	0,00	-0,42	0,00	-0,07	0,00	0,00
361	ADHEr, ACKr, ATPS4r, LDH_D, PPC		4,77	0,00	-1,18	-5,00	-0,15	12,79	-0,02	0,00	0,00
362	ADHEr, ACKr, LDH_D, PYRt2, SUCD4		2,88	0,00	-3,91	0,00	-0,22	0,00	-0,04	0,00	2,12
363	ADHEr, ATPS4r, FUM, LDH_D, SUCD4		6,51	0,00	-2,01	-2,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
364	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, MDH, SUCD4		6,51	0,00	-2,01	-2,00	-0,25	0,00	-0,04	0,00	0,00
365	ADHEr, ACKr, CBMK2, NADH6, PYK		25,89	0,00	-4,80	-20,00	-0,59	0,00	-0,10	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
366	ADHER, ACKr, NADH6, PYK, RPE	25,93	0,00	-4,82	-20,00	-0,60	0,00	-0,10	0,00	0,00
367	ADHER, ACKr, ASNS2, NADH6, PYK	25,95	0,00	-4,83	-20,00	-0,60	0,00	-0,10	0,00	0,00
368	ADHER, ACKr, NADH6, PYK, TAL	25,96	0,00	-4,84	-20,00	-0,60	0,00	-0,10	0,00	0,00
369	ADHER, ASPT, ATPS4r, FUM, LDH_D	4,50	0,00	-4,47	-5,00	-0,33	0,00	-0,05	0,00	1,84
370	ADHER, ASPT, ATPS4r, LDH_D, MDH	3,02	0,00	-2,92	0,00	-0,36	0,00	-0,06	0,00	0,00
371	ADHER, MDH, PFLi, PYK, THD2	12,56	0,00	-3,25	0,00	-0,40	0,00	-0,07	0,00	0,00
372	ADHER, FUM, PFLi, PYK, THD2	12,56	0,00	-3,25	0,00	-0,40	0,00	-0,07	0,00	0,00
373	ADHER, ACKr, FUM, LDH_D, NADH6	23,94	0,00	-4,61	-15,00	-0,57	2,16	-0,09	0,00	0,00
374	ADHER, ATPS4r, G6PDHy, LDH_D, SUCD4	7,29	0,00	-2,38	-2,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
375	ADHER, ATPS4r, LDH_D, PGL, SUCD4	7,29	0,00	-2,38	-2,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
376	ADHER, ATPS4r, LDH_D, PGDH, SUCD4	7,29	0,00	-2,38	-2,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
377	ADHER, GLYCL, PGL, PPC, THD2	-5,10	10,37	-1,24	-2,00	-0,15	0,00	-0,02	0,00	0,00
378	ADHER, G6PDHy, GLYCL, PPC, THD2	-5,10	10,37	-1,24	-2,00	-0,15	0,00	-0,02	0,00	0,00
379	ADHER, FTHFD, G6PDHy, PPC, THD2	-5,08	10,43	-1,22	-2,00	-0,15	0,00	-0,02	0,00	0,00
380	ADHER, FTHFD, PGL, PPC, THD2	-5,08	10,43	-1,22	-2,00	-0,15	0,00	-0,02	0,00	0,00
381	ADHER, MTHFC, PGL, PPC, THD2	-5,08	10,43	-1,22	-2,00	-0,15	0,00	-0,02	0,00	0,00
382	ADHER, G6PDHy, MTHFC, PPC, THD2	-5,08	10,43	-1,22	-2,00	-0,15	0,00	-0,02	0,00	0,00
383	ADHER, ATPS4r, LDH_D, PFLi, SUCD4	12,44	0,00	-2,76	-2,00	-0,34	0,00	-0,06	0,00	0,00
384	ADHER, ATPS4r, LDH_D, SUCD4, TAL	7,30	0,00	-2,40	-2,00	-0,30	0,00	-0,05	0,00	0,00
385	ADHER, ATPS4r, LDH_D, RPE, SUCD4	11,65	0,00	-2,41	-2,00	-0,30	0,00	-0,05	0,00	0,00
386	ADHER, ATPS4r, FUM, GLCpts, NADH6	10,51	2,86	-2,34	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
387	ADHER, ATPS4r, GLCpts, MDH, NADH6	10,51	2,86	-2,34	0,00	-0,29	0,00	-0,05	0,00	0,00
388	ADHER, ATPS4r, LDH_D, NADH6, PFLi	11,74	0,00	-2,93	0,00	-0,36	0,00	-0,06	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas t, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
389	ADHER, ACKr, MALS, NADH12, NADH6		27,12	0,00	-5,49	-20,00	-0,68	0,00	-0,11	0,00	0,00
390	ADHER, ACKr, ICL, NADH12, NADH6		27,12	0,00	-5,49	-20,00	-0,68	0,00	-0,11	0,00	0,00
391	ADHER, ACKr, CBMK2, LDH_D, NADH6		27,15	0,00	-5,51	-20,00	-0,68	0,00	-0,11	0,00	0,00
392	ADHER, ATPS4r, GLCpts, MDH, PFLi		11,83	0,00	-2,99	0,00	-0,37	0,00	-0,06	0,00	0,00
393	ADHER, ATPS4r, FUM, GLCpts, PFLi		11,83	0,00	-2,99	0,00	-0,37	0,00	-0,06	0,00	0,00
394	ADHER, ACKr, ASNS2, LDH_D, NADH6		27,21	0,00	-5,54	-20,00	-0,69	0,00	-0,11	0,00	0,00
395	ADHER, ACKr, ATPS4r, LDH_D, THD2		0,94	0,00	-3,26	-10,00	-0,40	0,00	-0,07	0,00	0,00
396	ADHER, GLCpts, GLUDy, PFLi, PGI		8,29	0,00	-1,32	0,00	-0,16	0,00	-0,03	0,00	0,00
397	ADHER, GLCpts, GLUDy, PFK, PFLi		8,31	0,00	-1,34	0,00	-0,17	0,00	-0,03	0,00	0,00
398	ADHER, FBA, GLCpts, GLUDy, PFLi		8,31	0,00	-1,34	0,00	-0,17	0,00	-0,03	0,00	0,00
399	ADHER, GLCpts, GLUDy, PFLi, TPI		8,31	0,00	-1,34	0,00	-0,17	0,00	-0,03	0,00	0,00
400	ADHER, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PGI		7,07	0,00	-0,99	0,00	-0,12	0,00	-0,02	0,00	0,00
401	ADHER, ATPS4r, GLCpts, NADH6, TPI		7,11	0,00	-1,00	0,00	-0,12	0,00	-0,02	0,00	0,00
402	ADHER, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PFK		7,11	0,00	-1,00	0,00	-0,12	0,00	-0,02	0,00	0,00
403	ADHER, ATPS4r, FBA, GLCpts, NADH6		7,11	0,00	-1,00	0,00	-0,12	0,00	-0,02	0,00	0,00
404	ADHER, GLCpts, PFLi, RPE, TPI		8,61	0,00	-1,49	0,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
405	ADHER, GLCpts, PFK, PFLi, RPE		8,61	0,00	-1,49	0,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
406	ADHER, FBA, GLCpts, PFLi, RPE		8,61	0,00	-1,49	0,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
407	ADHER, ATPS4r, NADH6, PFLi, PYK		10,57	0,00	-2,42	0,00	-0,30	0,00	-0,05	0,00	0,00
408	ADHER, GLCpts, PFK, PFLi, TAL		8,62	0,00	-1,49	0,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
409	ADHER, FBA, GLCpts, PFLi, TAL		8,62	0,00	-1,49	0,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
410	ADHER, GLCpts, PFLi, TAL, TPI		8,62	0,00	-1,49	0,00	-0,18	0,00	-0,03	0,00	0,00
411	ADHER, FBA, GLUDy, PFLi, RPE		8,73	0,00	-1,55	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
412	ADHER, GLUDy, PFK, PFLi, RPE		8,73	0,00	-1,55	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
413	ADHER, GLUDy, PFLi, RPE, TPI		8,73	0,00	-1,55	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
414	ADHER, GLUDy, PFLi, TAL, TPI		8,74	0,00	-1,56	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación	metabólicas t, ‡, #	H2O	LAC	NH4	NO3	PI	PYR	SO4	SUC	VAL
415	ADHEr, GLUDy, PFK, PFLi, TAL		8,74	0,00	-1,56	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
416	ADHEr, FBA, GLUDy, PFLi, TAL		8,74	0,00	-1,56	0,00	-0,19	0,00	-0,03	0,00	0,00
417	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, PFLi, SUCD4		9,67	0,00	-2,81	-2,00	-0,35	0,00	-0,06	0,00	0,00
418	ADHEr, FUM, LDH_D, PFLi, SUCD4		9,50	0,00	-1,95	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00
419	ADHEr, LDH_D, MDIL, PFLi, SUCD4		9,50	0,00	-1,95	0,00	-0,24	0,00	-0,04	0,00	0,00

Tabla 7. Estrategias de desactivación derivadas mediante OptKnock, suponiendo que PEP carboxiquinasa es reversible.

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
1	ADHER, NADH6	6,44	0,72	22,08	0,00	1,9	17,19	0,00	-20,00	0,00	44,88
2	ADHER, ENO	6,29	0,03	33,29	0,00	-6,29	33,43	0,00	-20,00	0,00	66,92
3	ADHER, PGM	6,29	0,03	33,29	0,00	-6,29	33,43	0,00	-20,00	0,00	66,92
4	ADHER, PPCK	5,67	0,57	25,42	0,00	-5,74	28,42	0,00	-20,00	0,00	57,91
5	ADHER, SUCD4	5,54	0,65	24,41	0,00	-5,63	27,79	0,00	-20,00	0,00	56,8
6	ADHER, ATPS4r	4,41	0,82	22,86	0,00	-4,52	27,15	0,00	-20,00	0,00	55,83
7	ADHER, PGI	1,81	0,52	0,00	0,00	-11,12	2,74	0,00	-20,00	0,00	56,18
8	ADHER, FUM	1,32	0,74	14,95	0,00	-13,58	18,85	0,00	-20,00	0,00	63,42
9	ADHER, HEX1	0,82	0,77	13,74	0,00	-14,47	17,74	0,00	-20,00	0,00	64,01
10	ADHER, MDH	0,72	0,67	14,49	0,00	-15,13	18,02	0,00	-20,00	0,00	65,94
11	ADHER, TPI	0,33	0,49	15,6	0,00	-16,86	18,16	0,00	-20,00	0,00	70,17
12	ADHER, FBA	0,33	0,49	15,6	0,00	-16,86	18,16	0,00	-20,00	0,00	70,17
13	ADHER, PFK	0,33	0,49	15,6	0,00	-16,86	18,16	0,00	-20,00	0,00	70,17
14	ADHER, HEX1, PGI	11,52	0,39	15,75	0,00	8,35	17,8	0,00	-20,00	0,00	36,34
15	ADHER, PFLi, PPCK	9,95	0,5	22,31	0,00	14,9	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,85
16	ADHER, PFLi, SUCD4	9,81	0,55	21,71	0,00	14,68	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,59
18	ADHER, NADH6, PFLi	9,71	0,58	21,27	0,00	14,52	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,4
19	ADHER, NADH6, PGM	7,82	0,08	30,86	0,00	9,99	13,48	0,00	-20,00	0,00	44,95
20	ADHER, ENO, NADH6	7,82	0,08	30,86	0,00	9,99	13,48	0,00	-20,00	0,00	44,95
21	ADHER, ASPT, MDH	7,51	0,53	20,76	0,00	-4,06	30,56	0,00	-20,00	0,00	55,08
22	ADHER, NADH6, PGI	7,36	0,35	27,02	0,00	0,27	21,51	0,00	-20,00	0,00	51,05
23	ADHER, NADH6, TPI	7,25	0,36	27,17	0,00	-0,05	21,8	0,00	-20,00	0,00	51,52
24	ADHER, FBA, NADH6	7,25	0,36	27,17	0,00	-0,05	21,8	0,00	-20,00	0,00	51,52
25	ADHER, NADH6, PFK	7,25	0,36	27,17	0,00	-0,05	21,8	0,00	-20,00	0,00	51,52
26	ADHER, NADH6, PPCK	6,92	0,52	25,03	0,00	-0,07	20,82	0,00	-20,00	0,00	49,54
27	ADHER, MDH, NADH6	6,76	0,59	24,04	0,00	-0,08	20,37	0,00	-20,00	0,00	48,62
28	ADHER, FUM, NADH6	6,6	0,67	23,01	0,00	-0,09	19,9	0,00	-20,00	0,00	47,66

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
29	ADHER, PPCK, THD2		6,55	0,56	23,75	0,00	-3,54	26,67	0,00	-20,00	0,00	54,38
30	ADHER,		6,53	0,77	21,1	0,00	5,45	13,37	0,00	-20,00	0,00	40,4
31	ADHER, NADH6, TAL		6,48	0,77	21,41	0,00	5,18	13,97	0,00	-20,00	0,00	40,88
32	ADHER, PGI, PPCK		6,21	0,3	28,99	0,00	-5,98	30,57	0,00	-20,00	0,00	61,72
33	ADHER, PGI, SUCD4		6,18	0,33	28,63	0,00	-5,93	30,35	0,00	-20,00	0,00	61,31
34	ADHER, ATPS4r, PPCK		6,15	0,61	23,38	0,00	-3,10	26,55	0,00	-20,00	0,00	54,24
35	ADHER, PFK, PPCK		6,13	0,31	29,1	0,00	-6,17	30,7	0,00	-20,00	0,00	61,98
36	ADHER, FBA, PPCK		6,13	0,31	29,1	0,00	-6,17	30,7	0,00	-20,00	0,00	61,98
37	ADHER, PPCK, TPI		6,13	0,31	29,1	0,00	-6,17	30,7	0,00	-20,00	0,00	61,98
38	ADHER, FBA, HEX1		6,11	0,32	28,91	0,00	-6,15	30,59	0,00	-20,00	0,00	61,78
39	ADHER, HEX1, PFK		6,11	0,32	28,91	0,00	-6,15	30,59	0,00	-20,00	0,00	61,78
40	ADHER, HEX1, TPI		6,11	0,32	28,91	0,00	-6,15	30,59	0,00	-20,00	0,00	61,78
41	ADHER, MDH, THD2		6,1	0,62	14,9	0,00	-3,07	18,16	0,00	-20,00	0,00	49,89
42	ADHER, SUCD4, TPI		6,09	0,33	28,75	0,00	-6,13	30,48	0,00	-20,00	0,00	61,59
43	ADHER, FBA, SUCD4		6,09	0,33	28,75	0,00	-6,13	30,48	0,00	-20,00	0,00	61,59
44	ADHER, PFK, SUCD4		6,09	0,33	28,75	0,00	-6,13	30,48	0,00	-20,00	0,00	61,59
45	ADHER, FUM, PFLi		5,96	0,7	15,28	0,00	4,93	0,00	0,00	-20,00	0,00	36,1
46	ADHER, PPCK, SUCD4		5,85	0,47	26,89	0,00	-5,92	29,33	0,00	-20,00	0,00	59,54
47	ADHER, PPCK, RPE		5,78	0,57	25,2	0,00	-5,45	28,19	0,00	-20,00	0,00	57,44
48	ADHER, GLCpts, PPCK		5,78	0,51	26,33	0,00	-5,85	28,99	0,00	-20,00	0,00	58,92
49	ADHER, GLUDy, MDH		5,78	0,51	26,3	0,00	-5,85	28,97	0,00	-20,00	0,00	58,89
50	ADHER, GLUDy, PPCK		5,77	0,52	26,2	0,00	-5,84	28,9	0,00	-20,00	0,00	58,78
51	ADHER, MDH, SUCD4		5,74	0,53	25,99	0,00	-5,81	28,78	0,00	-20,00	0,00	58,55
52	ADHER, PPCK, TAL		5,73	0,57	25,3	0,00	-5,59	28,3	0,00	-20,00	0,00	57,67
53	ADHER, FUM, PPCK		5,73	0,54	25,9	0,00	-5,80	28,72	0,00	-20,00	0,00	58,44
54	ADHER, MDH, PPCK		5,73	0,54	25,9	0,00	-5,80	28,72	0,00	-20,00	0,00	58,44
55	ADHER, RPE, SUCD4		5,68	0,64	24,22	0,00	-5,31	27,57	0,00	-20,00	0,00	56,34
56	ADHER, ME2, SUCD4		5,68	0,57	25,49	0,00	-5,75	28,46	0,00	-20,00	0,00	57,99

	Transformaciones destinadas a eliminación t, t, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
57	ADHeR, FUM, GLUDy		5,66	0,58	25,35	0,00	-5,74	28,38	0,00	-20,00	0,00	57,84
58	ADHeR, GLUDy, SUCD4		5,66	0,58	25,34	0,00	-5,74	28,37	0,00	-20,00	0,00	57,83
59	ADHeR, GLCpts, SUCD4		5,65	0,58	25,28	0,00	-5,73	28,34	0,00	-20,00	0,00	57,77
60	ADHeR, SUCD4, TAL		5,61	0,64	24,31	0,00	-5,46	27,67	0,00	-20,00	0,00	56,56
61	ADHeR, FUM, SUCD4		5,57	0,63	24,65	0,00	-5,66	27,94	0,00	-20,00	0,00	57,07
62	ADHeR, HEX1, SUCD4		5,56	0,64	24,55	0,00	-5,64	27,88	0,00	-20,00	0,00	56,95
63	ADHeR, CBMK2, SUCD4		5,55	0,64	24,49	0,00	-5,64	27,84	0,00	-20,00	0,00	56,89
64	ADHeR, FUM, HEX1		5,44	0,7	23,61	0,00	-5,53	27,29	0,00	-20,00	0,00	55,91
65	ADHeR, HEX1, PFLi		5,24	0,72	14,09	0,00	3,1	0,00	0,00	-20,00	0,00	38,1
66	ADHeR, ATPS4r, PGI		5,06	0,52	26,72	0,00	-4,66	29,44	0,00	-20,00	0,00	59,85
67	ADHeR, ATPS4r, FBA		4,91	0,53	26,89	0,00	-4,99	29,65	0,00	-20,00	0,00	60,29
68	ADHeR, ATPS4r, PFK		4,91	0,53	26,89	0,00	-4,99	29,65	0,00	-20,00	0,00	60,29
69	ADHeR, ATPS4r, TPI		4,91	0,53	26,89	0,00	-4,99	29,65	0,00	-20,00	0,00	60,29
70	ADHeR, PFLi, TPI		4,88	0,44	16,04	0,00	1,18	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,62
71	ADHeR, PFK, PFLi		4,88	0,44	16,04	0,00	1,18	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,62
72	ADHeR, FBA, PFLi		4,88	0,44	16,04	0,00	1,18	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,62
73	ADHeR, HEX1, THD2		4,87	0,74	22,12	0,00	-6,49	25,99	0,00	-20,00	0,00	56,39
74	ADHeR, ATPS4r, RPE		4,59	0,81	22,69	0,00	-4,12	26,91	0,00	-20,00	0,00	55,33
75	ADHeR, ATPS4r, GLUDy		4,56	0,73	24,1	0,00	-4,66	27,92	0,00	-20,00	0,00	57,2
76	ADHeR, ATPS4r, TAL		4,5	0,81	22,77	0,00	-4,31	27,02	0,00	-20,00	0,00	55,57
77	ADHeR, ATPS4r, CBMK2		4,42	0,81	22,97	0,00	-4,53	27,22	0,00	-20,00	0,00	55,95
78	ADHeR, EDA, PGI		4,21	0,51	0,00	0,00	-5,69	2,64	0,00	-20,00	0,00	48,84
79	ADHeR, PFLi, PGI		2,48	0,52	0,00	0,00	-8,45	0,00	0,00	-20,00	0,00	52,22
80	ADHeR, MDH, PFK		1,36	0,47	17,83	0,00	-14,86	20,31	0,00	-20,00	0,00	68,38
81	ADHeR, MDH, TPI		1,36	0,47	17,83	0,00	-14,86	20,31	0,00	-20,00	0,00	68,38
82	ADHeR, FBA, MDH		1,36	0,47	17,83	0,00	-14,86	20,31	0,00	-20,00	0,00	68,38
83	ADHeR, HEX1, RPE		1,13	0,76	13,77	0,00	-13,77	17,76	0,00	-20,00	0,00	63,09
84	ADHeR, MDH, RPE		1	0,67	14,51	0,00	-14,51	18,02	0,00	-20,00	0,00	65,11
85	ADHeR, HEX1, TAL		0,98	0,76	13,76	0,00	-14,10	17,75	0,00	-20,00	0,00	63,53

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
86	ADHER, MDH, TAL		0,86	0,67	14,5	0,00	-14,81	18,02	0,00	-20,00	0,00	65,51
87	ADHER, RPE, TPI		0,47	0,48	15,53	0,00	-16,54	18,07	0,00	-20,00	0,00	69,75
88	ADHER, PFK, RPE		0,47	0,48	15,53	0,00	-16,54	18,07	0,00	-20,00	0,00	69,75
89	ADHER, FBA, RPE		0,47	0,48	15,53	0,00	-16,54	18,07	0,00	-20,00	0,00	69,75
90	ADHER, PFK, TAL		0,4	0,49	15,57	0,00	-16,69	18,11	0,00	-20,00	0,00	69,95
91	ADHER, FBA, TAL		0,4	0,49	15,57	0,00	-16,69	18,11	0,00	-20,00	0,00	69,95
92	ADHER, HEX1, PFLi, PGI		14,2	0,34	13,81	0,00	21,29	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,25
93	ADHER, HEX1, NADH6, PGI		14,07	0,28	14,98	0,00	19,9	2,36	0,00	-20,00	0,00	19,31
94	ADHER, EDA, NADH6, PGI		14	0,31	14,58	0,00	19,89	2,18	0,00	-20,00	0,00	18,94
95	ADHER, ACKr, NADH6, PGI		13,92	0,34	14,1	0,00	21,85	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,55
96	ADHER, FRD2, LDH_D, MDH		13,31	0,25	5,13	0,00	13,27	19,78	0,00	-20,00	0,00	28,86
97	ADHER, ATPS4r, PGI, SUCD4		13,14	0,27	15,98	0,00	17,23	6,93	0,00	-20,00	0,00	24,84
98	ADHER, ATPS4r, FDH2, NADH6		12,33	0,49	15,46	0,00	19,46	0,00	0,00	-20,00	0,00	18,94
99	ADHER, ACKr, NADH6, TPI		12,03	0,46	12,29	0,00	28,02	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,58
100	ADHER, ACKr, FBA, NADH6		12,03	0,46	12,29	0,00	28,02	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,58
101	ADHER, ACKr, NADH6, PFK		12,03	0,46	12,29	0,00	28,02	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,58
102	ADHER, FRD2, LDH_D, ME2		11,95	0,26	4,09	0,00	7,62	17,42	4,3	-20,00	0,00	33,78
103	ADHER, HEX1, PGI, PPCK		11,82	0,22	18,07	0,00	8,1	19,23	0,00	-20,00	0,00	38,88
104	ADHER, EDA, PGI, PPCK		11,82	0,22	18,05	0,00	8,1	19,22	0,00	-20,00	0,00	38,86
105	ADHER, HEX1, PGI, SUCD4		11,77	0,25	17,66	0,00	8,15	18,98	0,00	-20,00	0,00	38,43
106	ADHER, EDA, PGI, SUCD4		11,76	0,26	17,62	0,00	8,15	18,95	0,00	-20,00	0,00	38,39
107	ADHER, ATPS4r, EDA, PGI		11,62	0,34	16,52	0,00	8,27	18,28	0,00	-20,00	0,00	37,18
108	ADHER, GLUDy, HEX1, PGI		11,59	0,35	16,29	0,00	8,29	18,13	0,00	-20,00	0,00	36,93
109	ADHER, MDH, PGL, THD2		11,18	0,48	13,34	0,00	4,81	23,87	0,00	-20,00	0,00	40,62
110	ADHER, G6PDHy, MDH, THD2		11,18	0,48	13,34	0,00	4,81	23,87	0,00	-20,00	0,00	40,62
111	ADHER, PFLi, PGI, PPCK		10,87	0,2	25,96	0,00	16,29	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,38
112	ADHER, PFLi, PPCK, TPI		10,83	0,2	26,02	0,00	16,23	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,46
113	ADHER, FBA, PFLi, PPCK		10,83	0,2	26,02	0,00	16,23	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,46
114	ADHER, PFK, PFLi, PPCK		10,83	0,2	26,02	0,00	16,23	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,46

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
115	ADHER, ACKr, MDH, NADH6	10,8	0,74	11,2	0,00	23,65	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,47
116	ADHER, NADH6, PFLi, PGI	10,79	0,23	25,57	0,00	16,16	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,21
117	ADHER, PFLi, PGI, SUCD4	10,79	0,23	25,57	0,00	16,16	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,21
118	ADHER, FBA, PFLi, SUCD4	10,74	0,23	25,64	0,00	16,09	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,3
119	ADHER, PFK, PFLi, SUCD4	10,74	0,23	25,64	0,00	16,09	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,3
120	ADHER, NADH6, PFK, PFLi	10,74	0,23	25,64	0,00	16,09	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,3
121	ADHER, FBA, NADH6, PFLi	10,74	0,23	25,64	0,00	16,09	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,3
122	ADHER, PFLi, SUCD4, TPI	10,74	0,23	25,64	0,00	16,09	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,3
123	ADHER, NADH6, PFLi, TPI	10,74	0,23	25,64	0,00	16,09	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,3
124	ADHER, HEX1, PFK, PFLi	10,73	0,24	25,61	0,00	16,08	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,28
125	ADHER, FBA, HEX1, PFLi	10,73	0,24	25,61	0,00	16,08	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,28
126	ADHER, HEX1, PFLi, TPI	10,73	0,24	25,61	0,00	16,08	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,28
127	ADHER, PFLi, PPCK, THD2	10,49	0,49	21,02	0,00	15,71	0,00	0,00	-20,00	0,00	24,49
128	ADHER, ACKr, GLUDy, NADH6	10,4	0,75	10,81	0,00	25,55	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,16
129	ADHER, ACKr,	10,28	0,77	10,7	0,00	25,38	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,2
130	ADHER, ACKr, AKGD, ATPS4r	10,24	0,58	10,55	0,00	11,67	22,3	0,00	-20,00	0,00	36,95
131	ADHER, ATPS4r, NADH6, PFLi	10,17	0,53	19,34	0,00	15,23	0,00	0,00	-20,00	0,00	24,21
132	ADHER, GLCpts, PFLi, PPCK	10,15	0,43	23,16	0,00	15,2	0,00	0,00	-20,00	0,00	26,22
133	ADHER, ACKr, ATPS4r, SUCOAS	10,12	0,58	10,44	0,00	10,6	23,88	0,00	-20,00	0,00	38,45
134	ADHER, ACKr, ME2, NADH6	10,11	0,77	10,53	0,00	22,07	0,00	0,00	-20,00	0,00	18,19
135	ADHER, GLUDy, PFLi, PPCK	10,1	0,45	22,94	0,00	15,12	0,00	0,00	-20,00	0,00	26,12
136	ADHER, ME2, PFLi, SUCD4	10,05	0,47	22,71	0,00	15,04	0,00	0,00	-20,00	0,00	26,02
137	ADHER, MDH, NADH6, PFLi	10,04	0,47	22,67	0,00	15,02	0,00	0,00	-20,00	0,00	26,01
138	ADHER, PFLi, PPCK, RPE	10,02	0,5	22,14	0,00	15	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,67
139	ADHER, PFLi, PPCK, TAL	9,99	0,5	22,22	0,00	14,95	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,76
140	ADHER, GLUDy, PFLi, SUCD4	9,98	0,49	22,45	0,00	14,95	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,91
141	ADHER, CBMK2, PFLi, PPCK	9,96	0,49	22,36	0,00	14,92	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,87
142	ADHER, ATPS4r, LDH_D, SUCD4	9,92	0,57	20,45	0,00	15,84	0,00	0,00	-20,00	0,00	24,48
143	ADHER, PFLi, RPE, SUCD4	9,9	0,54	21,57	0,00	14,81	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,41

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
144	ADHEr, ACKr, CBMK2, NADH6	9,86	0,85	10,32	0,00	24,74	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,34
145	ADHEr, PFLi, SUCD4, TAL	9,86	0,54	21,64	0,00	14,75	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,5
146	ADHEr, ACKr, NADH6, RPE	9,86	0,85	10,32	0,00	24,73	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,34
147	ADHEr, ACKr, FUM, NADH6	9,84	0,85	10,3	0,00	24,7	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,35
148	ADHEr, ACKr, NADH6, TAL	9,83	0,85	10,3	0,00	24,7	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,35
149	ADHEr, ACKr, ASNS2, NADH6	9,83	0,85	10,29	0,00	24,69	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,35
150	ADHEr, CBMK2, PFLi, SUCD4	9,83	0,54	21,78	0,00	14,7	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,62
151	ADHEr, ACKr, NADH12, NADH6	9,83	0,85	10,29	0,00	24,68	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,36
152	ADHEr, ACKr, NADH6, SO4r2	9,82	0,85	10,28	0,00	24,67	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,36
153	ADHEr, NADH12, NADH6, PFLi	9,81	0,55	21,71	0,00	14,68	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,59
154	ADHEr, FUM, NADH6, PFLi	9,8	0,55	21,69	0,00	14,67	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,58
155	ADHEr, ACKr, PGI, SUCD4	9,8	0,22	9,92	0,00	12,33	11,06	0,00	-20,00	0,00	30,56
156	ADHEr, NADH6, PFLi, TAL	9,75	0,58	21,19	0,00	14,6	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,3
157	ADHEr, CBMK2, NADH6, PFLi	9,72	0,58	21,33	0,00	14,55	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,43
158	ADHEr, FUM, HEX1, PFLi	9,55	0,63	20,62	0,00	14,29	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,11
159	ADHEr, MDH, NADH6, THD2	9,34	0,55	19,65	0,00	7,38	13,18	0,00	-20,00	0,00	36,73
160	ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6	9,28	0,55	19,75	0,00	7,2	13,35	0,00	-20,00	0,00	37,01
161	ADHEr, ATPS4r, FUM, NADH6	9,03	0,63	21,22	0,00	11,62	3,77	0,00	-20,00	0,00	29,45
162	ADHEr, ATPS4r, PGI, PPCK	8,97	0,26	23,6	0,00	0,95	24,98	0,00	-20,00	0,00	50,46
163	ADHEr, ASPT, MDH, NADH6	8,65	0,48	19,82	0,00	-0,06	26,01	0,00	-20,00	0,00	49,23
164	ADHEr, ATPS4r, NADH6, PPCK	8,62	0,48	23,04	0,00	6,28	13,23	0,00	-20,00	0,00	39,68
165	ADHEr, ASPT, MDH, THD2	8,6	0,5	18,6	0,00	-1,82	29,38	0,00	-20,00	0,00	51,55
166	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, SUCD4	8,49	0,65	21,41	0,00	14,16	2,07	0,00	-20,00	0,00	28,11
167	ADHEr, ASPT, MDH, PGI	8,36	0,23	23,87	0,00	-4,10	33,24	0,00	-20,00	0,00	58,77
168	ADHEr, ASPT, FBA, MDH	8,27	0,24	24,01	0,00	-4,27	33,31	0,00	-20,00	0,00	59,01
169	ADHEr, ASPT, MDH, PFK	8,27	0,24	24,01	0,00	-4,27	33,31	0,00	-20,00	0,00	59,01
170	ADHEr, ASPT, MDH, TPI	8,27	0,24	24,01	0,00	-4,27	33,31	0,00	-20,00	0,00	59,01
171	ADHEr, ATPS4r, PFK, PPCK	8,26	0,26	27,7	0,00	3,99	16,78	0,00	-20,00	0,00	46,33
172	ADHEr, ATPS4r, FBA, PPCK	8,26	0,26	27,7	0,00	3,99	16,78	0,00	-20,00	0,00	46,33

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
173	ADHER, ATPS4r, PPCK, TPI		8,26	0,26	27,7	0,00	3,99	16,78	0,00	-20,00	0,00	46,33
174	ADHER, ACKr, EDA, PGI		8,12	0,45	8,36	0,00	1,85	10,72	0,00	-20,00	0,00	42,04
175	ADHER, ATPS4r, HEX1, NADH6		7,99	0,67	21,56	0,00	6,75	10,4	0,00	-20,00	0,00	36,71
176	ADHER, NADH6, PPCK, THD2		7,88	0,5	23,49	0,00	2,67	18,21	0,00	-20,00	0,00	45,24
177	ADHER, ATPS4r, GLUDy, MDH		7,87	0,46	22,87	0,00	-0,07	23,7	0,00	-20,00	0,00	49,84
178	ADHER, ATPS4r, MDH, PPCK		7,86	0,49	22,44	0,00	0,04	23,43	0,00	-20,00	0,00	49,33
179	ADHER, ATPS4r, FUM, PPCK		7,86	0,49	22,44	0,00	0,04	23,43	0,00	-20,00	0,00	49,33
180	ADHER, ENO, NADH6, RPE		7,84	0,08	30,83	0,00	10,05	13,42	0,00	-20,00	0,00	44,85
181	ADHER, NADH6, PGM, RPE		7,84	0,08	30,83	0,00	10,05	13,42	0,00	-20,00	0,00	44,85
182	ADHER, NADH6, PGM, TAL		7,83	0,08	30,84	0,00	10,02	13,45	0,00	-20,00	0,00	44,9
183	ADHER, ENO, NADH6, TAL		7,83	0,08	30,84	0,00	10,02	13,45	0,00	-20,00	0,00	44,9
184	ADHER, ASPT, GLCpts, MDH		7,7	0,46	21,57	0,00	-4,11	31,25	0,00	-20,00	0,00	56,07
185	ADHER, ASPT, MDH, RPE		7,65	0,52	20,47	0,00	-3,75	30,4	0,00	-20,00	0,00	54,6
186	ADHER, ASPT, GLUDy, MDH		7,65	0,47	21,39	0,00	-4,10	31,1	0,00	-20,00	0,00	55,85
187	ADHER, ME2, NADH6, THD2		7,62	0,87	17,24	0,00	18,87	0,00	0,00	-20,00	0,00	23,43
188	ADHER, ME2, SUCD4, THD2		7,61	0,52	22,02	0,00	-0,99	24,76	0,00	-20,00	0,00	50,5
189	ADHER, ASPT, MDH, TAL		7,58	0,53	20,61	0,00	-3,90	30,48	0,00	-20,00	0,00	54,83
190	ADHER, NADH6, PGI, PPCK		7,58	0,23	28,71	0,00	0,18	22,36	0,00	-20,00	0,00	52,73
191	ADHER, FUM, PPCK, THD2		7,55	0,49	22,66	0,00	-1,33	25,25	0,00	-20,00	0,00	51,43
192	ADHER, MDH, PPCK, THD2		7,55	0,49	22,66	0,00	-1,33	25,25	0,00	-20,00	0,00	51,43
193	ADHER, GLUDy, MDH, THD2		7,56	0,47	23,1	0,00	-1,46	25,55	0,00	-20,00	0,00	51,99
194	ADHER, ASPT, CBMK2, MDH		7,52	0,52	20,82	0,00	-4,06	30,61	0,00	-20,00	0,00	55,15
195	ADHER, ATPS4r, FBA, SUCD4		7,51	0,42	25,99	0,00	6,86	13,76	0,00	-20,00	0,00	42,72
196	ADHER, ATPS4r, PFK, SUCD4		7,51	0,42	25,99	0,00	6,86	13,76	0,00	-20,00	0,00	42,72
197	ADHER, ATPS4r, SUCD4, TPI		7,51	0,42	25,99	0,00	6,86	13,76	0,00	-20,00	0,00	42,72
198	ADHER, FBA, NADH6, PPCK		7,5	0,24	28,8	0,00	-0,03	22,54	0,00	-20,00	0,00	53,03
199	ADHER, NADH6, PFK, PPCK		7,5	0,24	28,8	0,00	-0,03	22,54	0,00	-20,00	0,00	53,03
200	ADHER, NADH6, PPCK, TPI		7,5	0,24	28,8	0,00	-0,03	22,54	0,00	-20,00	0,00	53,03
201	ADHER, HEX1, PFLi, THD2		7,47	0,69	14,32	0,00	8,09	0,00	0,00	-20,00	0,00	31,52

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
202	ADHEr, HEX1, NADH6, PFK	7,46	0,26	28,53	0,00	-0,04	22,42	0,00	-20,00	0,00	52,78
203	ADHEr, FBA, HEX1, NADH6	7,46	0,26	28,53	0,00	-0,04	22,42	0,00	-20,00	0,00	52,78
204	ADHEr, HEX1, NADH6, TPI	7,46	0,26	28,53	0,00	-0,04	22,42	0,00	-20,00	0,00	52,78
205	ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH	7,44	0,58	13,04	0,00	6,96	0,00	0,00	-20,00	0,00	33,76
206	ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL	7,44	0,58	13,04	0,00	6,96	0,00	0,00	-20,00	0,00	33,76
207	ADHEr, GLUDy, NADH6, PGI	7,43	0,32	27,55	0,00	0,24	21,78	0,00	-20,00	0,00	51,58
208	ADHEr, ACKr, FRD2, LDH_D	7,42	0,97	7,95	0,00	15,46	13,33	0,00	-20,00	0,00	29,24
209	ADHEr, ACKr, LDH_D, SUCD4	7,42	0,97	7,95	2,12	14,4	13,33	0,00	-20,00	0,00	30,3
210	ADHEr, ATPS4r, FUM, GLUDy	7,38	0,54	24,25	0,00	2,47	17,14	0,00	-20,00	0,00	45,22
211	ADHEr, NADH6, PFK, RPE	7,34	0,36	27,05	0,00	0,21	21,57	0,00	-20,00	0,00	51,14
212	ADHEr, FBA, NADH6, RPE	7,34	0,36	27,05	0,00	0,21	21,57	0,00	-20,00	0,00	51,14
213	ADHEr, NADH6, RPE, TPI	7,34	0,36	27,05	0,00	0,21	21,57	0,00	-20,00	0,00	51,14
214	ADHEr, FBA, GLUDy, NADH6	7,33	0,32	27,69	0,00	-0,04	22,04	0,00	-20,00	0,00	52
215	ADHEr, GLUDy, NADH6, PFK	7,33	0,32	27,69	0,00	-0,04	22,04	0,00	-20,00	0,00	52
216	ADHEr, GLUDy, NADH6, TPI	7,33	0,32	27,69	0,00	-0,04	22,04	0,00	-20,00	0,00	52
217	ADHEr, ATPS4r, FUM, HEX1	7,31	0,66	21,12	0,00	0,9	20,04	0,00	-20,00	0,00	45,88
218	ADHEr, NADH6, TAL, TPI	7,3	0,36	27,1	0,00	0,09	21,68	0,00	-20,00	0,00	51,32
219	ADHEr, NADH6, PFK, TAL	7,3	0,36	27,1	0,00	0,09	21,68	0,00	-20,00	0,00	51,32
220	ADHEr, FBA, NADH6, TAL	7,3	0,36	27,1	0,00	0,09	21,68	0,00	-20,00	0,00	51,32
221	ADHEr, ATPS4r, MDH, THD2	7,27	0,62	19,64	0,00	-1,10	22,88	0,00	-20,00	0,00	49
222	ADHEr, GLUDy, MDH, NADH6	7,06	0,45	25,98	0,00	-0,06	21,26	0,00	-20,00	0,00	50,42
223	ADHEr, GLCpts, NADH6, PPCK	7,06	0,45	25,94	0,00	-0,06	21,24	0,00	-20,00	0,00	50,38
224	ADHEr, NADH6, PPCK, RPE	7,05	0,52	24,82	0,00	0,3	20,47	0,00	-20,00	0,00	48,96
225	ADHEr, GLUDy, NADH6, PPCK	7,02	0,47	25,73	0,00	-0,06	21,14	0,00	-20,00	0,00	50,18
226	ADHEr, FUM, NADH6, PPCK	7,01	0,47	25,63	0,00	-0,06	21,1	0,00	-20,00	0,00	50,09
227	ADHEr, MDH, NADH6, PPCK	7,01	0,47	25,63	0,00	-0,06	21,1	0,00	-20,00	0,00	50,09
228	ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D	7	0,32	0,00	0,00	17,78	8,35	0,00	-20,00	0,00	21,13
229	ADHEr, NADH6, PPCK, TAL	6,98	0,52	24,92	0,00	0,12	20,64	0,00	-20,00	0,00	49,23
230	ADHEr, FUM, GLUDy, NADH6	6,92	0,52	25,04	0,00	-0,07	20,83	0,00	-20,00	0,00	49,55

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
231	ADHER, GLCpts, MDH, NADH6	6,91	0,52	24,98	0,00	-0,07	20,8	0,00	-20,00	0,00	49,49
232	ADHER, MDH, NADH6, RPE	6,91	0,59	23,79	0,00	0,34	19,96	0,00	-20,00	0,00	47,94
233	ADHER, MDH, NADH6, TAL	6,84	0,59	23,91	0,00	0,14	20,16	0,00	-20,00	0,00	48,26
234	ADHER, HEX1, NADH6, THD2	6,83	0,92	18,08	0,00	17,16	1,07	0,00	-20,00	0,00	25,7
235	ADHER, FUM, NADH6, RPE	6,77	0,66	22,78	0,00	0,38	19,47	0,00	-20,00	0,00	46,96
236	ADHER, CBMK2, MDH, NADH6	6,77	0,59	24,11	0,00	-0,08	20,4	0,00	-20,00	0,00	48,68
237	ADHER, FUM, ME2, NADH6	6,76	0,59	24,04	0,00	-0,08	20,37	0,00	-20,00	0,00	48,62
238	ADHER, FUM, NADH6, TAL	6,69	0,66	22,89	0,00	0,16	19,68	0,00	-20,00	0,00	47,29
239	ADHER, ATPS4r, MDH, PGDH	6,64	0,6	16,99	0,00	6,42	0,00	0,00	-20,00	0,00	35,28
240	ADHER, FUM, HEX1, NADH6	6,64	0,65	23,23	0,00	-0,09	20,01	0,00	-20,00	0,00	47,87
241	ADHER, CBMK2, FUM, NADH6	6,61	0,66	23,09	0,00	-0,09	19,94	0,00	-20,00	0,00	47,74
242	ADHER, GLCpts, PPCK, THD2	6,56	0,49	24,86	0,00	-3,91	27,44	0,00	-20,00	0,00	55,8
243	ADHER, GLUDy, PPCK, THD2	6,56	0,5	24,67	0,00	-3,84	27,31	0,00	-20,00	0,00	55,57
244	ADHER, CBMK2, NADH6, TAL	6,49	0,77	21,51	0,00	5,18	14,02	0,00	-20,00	0,00	40,97
245	ADHER, ATPS4r, MDH, TAL	6,48	0,61	16,56	0,00	5,95	0,00	0,00	-20,00	0,00	35,78
246	ADHER, ATPS4r, GLUDy, NADH6	6,45	0,65	22,52	0,00	1,91	16,48	0,00	-20,00	0,00	45,54
247	ADHER, PGI, PPCK, SUCD4	6,33	0,22	30,11	0,00	-6,16	31,28	0,00	-20,00	0,00	62,99
248	ADHER, ATPS4r, MDH, RPE	6,33	0,61	16,17	0,00	5,52	0,00	0,00	-20,00	0,00	36,25
249	ADHER, FBP, PGM, THD2	6,33	0,03	33,21	0,00	-6,19	33,35	0,00	-20,00	0,00	66,75
250	ADHER, ENO, FBP, THD2	6,33	0,03	33,21	0,00	-6,19	33,35	0,00	-20,00	0,00	66,75
251	ADHER, FBA, PGM, THD2	6,33	0,03	33,21	0,00	-6,19	33,35	0,00	-20,00	0,00	66,75
252	ADHER, ENO, FBA, THD2	6,33	0,03	33,21	0,00	-6,19	33,35	0,00	-20,00	0,00	66,75
253	ADHER, ENO, THD2, TPI	6,33	0,03	33,21	0,00	-6,19	33,35	0,00	-20,00	0,00	66,75
254	ADHER, PGM, THD2, TPI	6,33	0,03	33,21	0,00	-6,19	33,35	0,00	-20,00	0,00	66,75
255	ADHER, GLCpts, PGI, PPCK	6,28	0,26	29,59	0,00	-6,08	30,96	0,00	-20,00	0,00	62,41
256	ADHER, FBA, HEX1, PPCK	6,28	0,22	30,24	0,00	-6,31	31,41	0,00	-20,00	0,00	63,24
257	ADHER, HEX1, PFK, PPCK	6,28	0,22	30,24	0,00	-6,31	31,41	0,00	-20,00	0,00	63,24
258	ADHER, HEX1, PPCK, TPI	6,28	0,22	30,24	0,00	-6,31	31,41	0,00	-20,00	0,00	63,24
259	ADHER, PPCK, SUCD4, TPI	6,27	0,23	30,17	0,00	-6,30	31,37	0,00	-20,00	0,00	63,17

	Transformaciones destinadas a eliminación †, ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
260	ADHEr, PFK, PPCK, SUCD4		6,27	0,23	30,17	0,00	-6,30	31,37	0,00	-20,00	0,00	63,17
261	ADHEr, FBA, PPCK, SUCD4		6,27	0,23	30,17	0,00	-6,30	31,37	0,00	-20,00	0,00	63,17
262	ADHEr, GLUDy, PGI, PPCK		6,26	0,27	29,44	0,00	-6,06	30,86	0,00	-20,00	0,00	62,23
263	ADHEr, GLQpts, PGI, SUCD4		6,24	0,28	29,26	0,00	-6,03	30,74	0,00	-20,00	0,00	62,02
264	ADHEr, FUM, GLUDy, PGI		6,24	0,29	29,24	0,00	-6,02	30,73	0,00	-20,00	0,00	62
265	ADHEr, GLUDy, MDH, PGI		6,24	0,29	29,24	0,00	-6,02	30,73	0,00	-20,00	0,00	62
266	ADHEr, FBA, HEX1, SUCD4		6,24	0,25	29,95	0,00	-6,27	31,23	0,00	-20,00	0,00	62,93
267	ADHEr, HEX1, SUCD4, TPI		6,24	0,25	29,95	0,00	-6,27	31,23	0,00	-20,00	0,00	62,93
268	ADHEr, HEX1, PFK, SUCD4		6,24	0,25	29,95	0,00	-6,27	31,23	0,00	-20,00	0,00	62,93
269	ADHEr, GLUDy, PGI, SUCD4		6,23	0,29	29,14	0,00	-6,01	30,67	0,00	-20,00	0,00	61,88
270	ADHEr, FUM, HEX1, THD2		6,21	0,69	22,25	0,00	-3,64	25,83	0,00	-20,00	0,00	52,95
271	ADHEr, FBA, GLQpts, PPCK		6,21	0,26	29,69	0,00	-6,24	31,07	0,00	-20,00	0,00	62,64
272	ADHEr, GLQpts, PFK, PPCK		6,21	0,26	29,69	0,00	-6,24	31,07	0,00	-20,00	0,00	62,64
273	ADHEr, GLQpts, PPCK, TPI		6,21	0,26	29,69	0,00	-6,24	31,07	0,00	-20,00	0,00	62,64
274	ADHEr, PFK, PPCK, RPE		6,2	0,3	29,01	0,00	-6,02	30,6	0,00	-20,00	0,00	61,77
275	ADHEr, PPCK, RPE, TPI		6,2	0,3	29,01	0,00	-6,02	30,6	0,00	-20,00	0,00	61,77
276	ADHEr, FBA, PPCK, RPE		6,2	0,3	29,01	0,00	-6,02	30,6	0,00	-20,00	0,00	61,77
277	ADHEr, GLUDy, PFK, PPCK		6,19	0,27	29,54	0,00	-6,23	30,98	0,00	-20,00	0,00	62,47
278	ADHEr, GLUDy, PPCK, TPI		6,19	0,27	29,54	0,00	-6,23	30,98	0,00	-20,00	0,00	62,47
279	ADHEr, FBA, GLUDy, PPCK		6,19	0,27	29,54	0,00	-6,23	30,98	0,00	-20,00	0,00	62,47
280	ADHEr, ATPS4r, ME2, THD2		6,19	0,71	21,49	0,00	-2,37	25,2	0,00	-20,00	0,00	51,73
281	ADHEr, HEX1, PFK, RPE		6,18	0,32	28,82	0,00	-5,99	30,48	0,00	-20,00	0,00	61,55
282	ADHEr, HEX1, RPE, TPI		6,18	0,32	28,82	0,00	-5,99	30,48	0,00	-20,00	0,00	61,55
283	ADHEr, FBA, HEX1, RPE		6,18	0,32	28,82	0,00	-5,99	30,48	0,00	-20,00	0,00	61,55
284	ADHEr, FBA, PPCK, TAL		6,17	0,31	29,05	0,00	-6,09	30,65	0,00	-20,00	0,00	61,87
285	ADHEr, PPCK, TAL, TPI		6,17	0,31	29,05	0,00	-6,09	30,65	0,00	-20,00	0,00	61,87
286	ADHEr, PFK, PPCK, TAL		6,17	0,31	29,05	0,00	-6,09	30,65	0,00	-20,00	0,00	61,87
287	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, PPCK		6,17	0,55	24,36	0,00	-3,40	27,23	0,00	-20,00	0,00	55,5
288	ADHEr, FBA, GLUDy, HEX1		6,17	0,29	29,36	0,00	-6,20	30,87	0,00	-20,00	0,00	62,28

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
289	ADHer, GLUDy, HEX1, TPI		6,17	0,29	29,36	0,00	-6,20	30,87	0,00	-20,00	0,00	62,28
290	ADHer, GLUDy, HEX1, PFK		6,17	0,29	29,36	0,00	-6,20	30,87	0,00	-20,00	0,00	62,28
291	ADHer, GLCpts, SUCD4, TPI		6,16	0,29	29,36	0,00	-6,20	30,86	0,00	-20,00	0,00	62,27
292	ADHer, FBA, GLCpts, SUCD4		6,16	0,29	29,36	0,00	-6,20	30,86	0,00	-20,00	0,00	62,27
293	ADHer, GLCpts, PFK, SUCD4		6,16	0,29	29,36	0,00	-6,20	30,86	0,00	-20,00	0,00	62,27
294	ADHer, GLUDy, MDH, PFK		6,16	0,29	29,34	0,00	-6,20	30,85	0,00	-20,00	0,00	62,25
295	ADHer, FBA, GLUDy, MDH		6,16	0,29	29,34	0,00	-6,20	30,85	0,00	-20,00	0,00	62,25
296	ADHer, FBA, FUM, GLUDy		6,16	0,29	29,34	0,00	-6,20	30,85	0,00	-20,00	0,00	62,25
297	ADHer, FUM, GLUDy, PFK		6,16	0,29	29,34	0,00	-6,20	30,85	0,00	-20,00	0,00	62,25
298	ADHer, GLUDy, MDH, TPI		6,16	0,29	29,34	0,00	-6,20	30,85	0,00	-20,00	0,00	62,25
299	ADHer, FUM, GLUDy, TPI		6,16	0,29	29,34	0,00	-6,20	30,85	0,00	-20,00	0,00	62,25
300	ADHer, RPE, SUCD4, TPI		6,16	0,33	28,65	0,00	-5,97	30,37	0,00	-20,00	0,00	61,36
301	ADHer, PFK, RPE, SUCD4		6,16	0,33	28,65	0,00	-5,97	30,37	0,00	-20,00	0,00	61,36
302	ADHer, FBA, RPE, SUCD4		6,16	0,33	28,65	0,00	-5,97	30,37	0,00	-20,00	0,00	61,36
303	ADHer, GLUDy, PFK, SUCD4		6,15	0,3	29,25	0,00	-6,19	30,8	0,00	-20,00	0,00	62,15
304	ADHer, FBA, GLUDy, SUCD4		6,15	0,3	29,25	0,00	-6,19	30,8	0,00	-20,00	0,00	62,15
305	ADHer, GLUDy, SUCD4, TPI		6,15	0,3	29,25	0,00	-6,19	30,8	0,00	-20,00	0,00	62,15
306	ADHer, HEX1, PFK, TAL		6,14	0,32	28,86	0,00	-6,07	30,53	0,00	-20,00	0,00	61,66
307	ADHer, FBA, HEX1, TAL		6,14	0,32	28,86	0,00	-6,07	30,53	0,00	-20,00	0,00	61,66
308	ADHer, HEX1, TAL, TPI		6,14	0,32	28,86	0,00	-6,07	30,53	0,00	-20,00	0,00	61,66
309	ADHer, PFK, SUCD4, TAL		6,13	0,33	28,7	0,00	-6,05	30,43	0,00	-20,00	0,00	61,47
310	ADHer, FBA, SUCD4, TAL		6,13	0,33	28,7	0,00	-6,05	30,43	0,00	-20,00	0,00	61,47
311	ADHer, SUCD4, TAL, TPI		6,13	0,33	28,7	0,00	-6,05	30,43	0,00	-20,00	0,00	61,47
312	ADHer, FUM, ME2, THD2		6,1	0,62	14,9	0,00	-3,07	18,16	0,00	-20,00	0,00	49,89
313	ADHer, ATPS4r, ME2, SUCD4		6,04	0,65	18,68	0,00	0,48	22,08	0,00	-20,00	0,00	48,37
314	ADHer, PPCK, PYK, SUCD4		6	0,38	28,04	0,00	-6,05	30,04	0,00	-20,00	0,00	60,81
315	ADHer, GLCpts, PPCK, SUCD4		5,97	0,4	27,84	0,00	-6,03	29,92	0,00	-20,00	0,00	60,59
316	ADHer, PPCK, RPE, SUCD4		5,95	0,46	26,74	0,00	-5,68	29,16	0,00	-20,00	0,00	59,19
317	ADHer, FUM, GLUDy, PPCK		5,94	0,42	27,58	0,00	-6,00	29,76	0,00	-20,00	0,00	60,3

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
318	ADHEr, GLUDy, MDH, PPCK	5,94	0,42	27,58	0,00	-6,00	29,76	0,00	-20,00	0,00	60,3
319	ADHEr, GLUDy, PPCK, SUCD4	5,94	0,42	27,54	0,00	-5,99	29,74	0,00	-20,00	0,00	60,27
320	ADHEr, PPCK, SUCD4, TAL	5,9	0,46	26,81	0,00	-5,79	29,24	0,00	-20,00	0,00	59,36
321	ADHEr, GLQpts, GLUDy, MDH	5,89	0,45	27,19	0,00	-5,95	29,52	0,00	-20,00	0,00	59,87
322	ADHEr, GLQpts, PPCK, RPE	5,89	0,51	26,14	0,00	-5,59	28,78	0,00	-20,00	0,00	58,51
323	ADHEr, GLUDy, MDH, RPE	5,88	0,51	26,12	0,00	-5,59	28,77	0,00	-20,00	0,00	58,49
324	ADHEr, GLUDy, PPCK, RPE	5,87	0,52	26	0,00	-5,57	28,69	0,00	-20,00	0,00	58,35
325	ADHEr, GLQpts, GLUDy, PPCK	5,87	0,46	27,02	0,00	-5,93	29,42	0,00	-20,00	0,00	59,69
326	ADHEr, GLQpts, MDH, SUCD4	5,86	0,46	26,97	0,00	-5,93	29,38	0,00	-20,00	0,00	59,63
327	ADHEr, MDH, RPE, SUCD4	5,85	0,53	25,81	0,00	-5,54	28,57	0,00	-20,00	0,00	58,14
328	ADHEr, GLQpts, MDH, PPCK	5,85	0,47	26,83	0,00	-5,91	29,29	0,00	-20,00	0,00	59,47
329	ADHEr, FUM, GLQpts, PPCK	5,85	0,47	26,83	0,00	-5,91	29,29	0,00	-20,00	0,00	59,47
330	ADHEr, MDH, PPCK, RPE	5,84	0,54	25,7	0,00	-5,53	28,5	0,00	-20,00	0,00	58,02
331	ADHEr, FUM, PPCK, RPE	5,84	0,54	25,7	0,00	-5,53	28,5	0,00	-20,00	0,00	58,02
332	ADHEr, GLQpts, PPCK, TAL	5,84	0,51	26,23	0,00	-5,72	28,88	0,00	-20,00	0,00	58,71
333	ADHEr, GLUDy, MDH, TAL	5,83	0,51	26,21	0,00	-5,71	28,86	0,00	-20,00	0,00	58,68
334	ADHEr, MDH, PPCK, PYK	5,82	0,47	26,84	0,00	-5,98	29,28	0,00	-20,00	0,00	59,61
335	ADHEr, FUM, PPCK, PYK	5,82	0,47	26,84	0,00	-5,98	29,28	0,00	-20,00	0,00	59,61
336	ADHEr, GLUDy, PPCK, TAL	5,82	0,52	26,09	0,00	-5,70	28,79	0,00	-20,00	0,00	58,55
337	ADHEr, FUM, GLUDy, SUCD4	5,81	0,49	26,51	0,00	-5,87	29,1	0,00	-20,00	0,00	59,12
338	ADHEr, MDH, SUCD4, TAL	5,8	0,53	25,9	0,00	-5,67	28,67	0,00	-20,00	0,00	58,33
339	ADHEr, GLQpts, ME2, SUCD4	5,8	0,5	26,45	0,00	-5,86	29,06	0,00	-20,00	0,00	59,05
340	ADHEr, ME2, RPE, SUCD4	5,79	0,57	25,28	0,00	-5,46	28,24	0,00	-20,00	0,00	57,53
341	ADHEr, FUM, PPCK, TAL	5,79	0,54	25,79	0,00	-5,66	28,61	0,00	-20,00	0,00	58,22
342	ADHEr, MDH, PPCK, TAL	5,79	0,54	25,79	0,00	-5,66	28,61	0,00	-20,00	0,00	58,22
343	ADHEr, GLUDy, PRO1z, SUCD4	5,78	0,51	26,35	0,00	-5,85	29	0,00	-20,00	0,00	58,95
344	ADHEr, FUM, GLUDy, RPE	5,78	0,57	25,18	0,00	-5,45	28,18	0,00	-20,00	0,00	57,43
345	ADHEr, GLUDy, RPE, SUCD4	5,78	0,57	25,17	0,00	-5,45	28,17	0,00	-20,00	0,00	57,41
346	ADHEr, GLQpts, RPE, SUCD4	5,78	0,57	25,15	0,00	-5,44	28,15	0,00	-20,00	0,00	57,39

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
347	ADHer, FUM, GLUDy, ME2	5,78	0,51	26,3	0,00	-5,85	28,97	0,00	-20,00	0,00	58,89
348	ADHer, GLUDy, ME2, SUCD4	5,78	0,51	26,3	0,00	-5,85	28,96	0,00	-20,00	0,00	58,88
349	ADHer, FUM, GLCpts, GLUDy	5,77	0,52	26,22	0,00	-5,84	28,91	0,00	-20,00	0,00	58,8
350	ADHer, GLCpts, GLUDy, SUCD4	5,76	0,52	26,17	0,00	-5,83	28,88	0,00	-20,00	0,00	58,74
351	ADHer, FUM, ME2, SUCD4	5,74	0,53	25,99	0,00	-5,81	28,78	0,00	-20,00	0,00	58,55
352	ADHer, ME2, SUCD4, TAL	5,74	0,57	25,38	0,00	-5,60	28,34	0,00	-20,00	0,00	57,75
353	ADHer, FUM, GLUDy, TAL	5,72	0,58	25,26	0,00	-5,59	28,27	0,00	-20,00	0,00	57,62
354	ADHer, GLUDy, SUCD4, TAL	5,72	0,58	25,25	0,00	-5,58	28,26	0,00	-20,00	0,00	57,61
355	ADHer, GLCpts, SUCD4, TAL	5,72	0,58	25,21	0,00	-5,58	28,24	0,00	-20,00	0,00	57,57
356	ADHer, ME2, PGL, THD2	5,71	0,95	0,00	0,00	6,29	15,52	0,00	-20,00	0,00	40,16
357	ADHer, G6PDHy, ME2, THD2	5,71	0,95	0,00	0,00	6,29	15,52	0,00	-20,00	0,00	40,16
358	ADHer, FUM, RPE, SUCD4	5,71	0,62	24,48	0,00	-5,35	27,73	0,00	-20,00	0,00	56,63
359	ADHer, HEX1, RPE, SUCD4	5,69	0,63	24,34	0,00	-5,32	27,64	0,00	-20,00	0,00	56,47
360	ADHer, CBMK2, GLU5K, PPCK	5,68	0,57	25,51	0,00	-5,76	28,48	0,00	-20,00	0,00	58,02
361	ADHer, CBMK2, G5SD, PPCK	5,68	0,57	25,51	0,00	-5,76	28,48	0,00	-20,00	0,00	58,02
362	ADHer, ASNS2, CBMK2, PPCK	5,68	0,57	25,51	0,00	-5,76	28,48	0,00	-20,00	0,00	58,02
363	ADHer, CBMK2, PPCK, SO4I2	5,68	0,57	25,5	0,00	-5,75	28,47	0,00	-20,00	0,00	58
364	ADHer, GLUDy, HEX1, SUCD4	5,67	0,57	25,42	0,00	-5,75	28,42	0,00	-20,00	0,00	57,92
365	ADHer, FUM, SUCD4, TAL	5,64	0,63	24,56	0,00	-5,49	27,83	0,00	-20,00	0,00	56,84
366	ADHer, HEX1, SUCD4, TAL	5,63	0,63	24,44	0,00	-5,48	27,75	0,00	-20,00	0,00	56,7
367	ADHer, FUM, HEX1, SUCD4	5,62	0,6	25,02	0,00	-5,70	28,17	0,00	-20,00	0,00	57,47
368	ADHer, FUM, HEX1, RPE	5,58	0,7	23,35	0,00	-5,18	27,02	0,00	-20,00	0,00	55,35
369	ADHer, CBMK2, FUM, SUCD4	5,58	0,62	24,73	0,00	-5,67	27,99	0,00	-20,00	0,00	57,15
370	ADHer, HEX1, PFLi, RPE	5,54	0,72	14,12	0,00	3,77	0,00	0,00	-20,00	0,00	37,22
371	ADHer, FUM, HEX1, TAL	5,51	0,7	23,47	0,00	-5,35	27,15	0,00	-20,00	0,00	55,62
372	ADHer, CBMK2, FUM, HEX1	5,45	0,7	23,69	0,00	-5,54	27,34	0,00	-20,00	0,00	56
373	ADHer, HEX1, PFLi, TAL	5,4	0,72	14,11	0,00	3,45	0,00	0,00	-20,00	0,00	37,64
374	ADHer, GLYCL, HEX1, PFLi	5,25	0,72	14,1	0,00	3,09	0,00	0,00	-20,00	0,00,09	38,1
375	ADHer, ATPS4r, GLUDy, PGI	5,14	0,46	27,54	0,00	-4,79	29,95	0,00	-20,00	0,00	60,78

	Transformaciones destinadas a eliminación †, ‡, #	metabólicas	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
376	ADHEr, PFLi, PGDH, PGI		5,08	0,43	16,39	0,00	1,66	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,14
377	ADHEr, PFLi, PGI, TAL		5,05	0,43	16,21	0,00	1,57	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,21
378	ADHEr, ATPS4r, PFK, RPE		5,03	0,52	26,76	0,00	-4,73	29,48	0,00	-20,00	0,00	59,94
379	ADHEr, ATPS4r, FBA, RPE		5,03	0,52	26,76	0,00	-4,73	29,48	0,00	-20,00	0,00	59,94
380	ADHEr, ATPS4r, RPE, TPI		5,03	0,52	26,76	0,00	-4,73	29,48	0,00	-20,00	0,00	59,94
381	ADHEr, PFLi, PGI, RPE		5,02	0,43	16,04	0,00	1,47	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,27
382	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, TPI		5,02	0,47	27,7	0,00	-5,08	30,15	0,00	-20,00	0,00	61,18
383	ADHEr, ATPS4r, FBA, GLUDy		5,02	0,47	27,7	0,00	-5,08	30,15	0,00	-20,00	0,00	61,18
384	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, PFK		5,02	0,47	27,7	0,00	-5,08	30,15	0,00	-20,00	0,00	61,18
385	ADHEr, FBA, PFLi, PGI		5,01	0,44	15,95	0,00	1,43	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,31
386	ADHEr, PFK, PFLi, PGI		5,01	0,44	15,95	0,00	1,43	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,31
387	ADHEr, PFLi, PGI, TPI		5,01	0,44	15,95	0,00	1,43	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,31
388	ADHEr, PFLi, RPE, TPI		4,99	0,44	15,97	0,00	1,38	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,37
389	ADHEr, PFK, PFLi, RPE		4,99	0,44	15,97	0,00	1,38	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,37
390	ADHEr, FBA, PFLi, RPE		4,99	0,44	15,97	0,00	1,38	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,37
391	ADHEr, ATPS4r, PFK, TAL		4,98	0,52	26,82	0,00	-4,85	29,56	0,00	-20,00	0,00	60,1
392	ADHEr, ATPS4r, FBA, TAL		4,98	0,52	26,82	0,00	-4,85	29,56	0,00	-20,00	0,00	60,1
393	ADHEr, ATPS4r, TAL, TPI		4,98	0,52	26,82	0,00	-4,85	29,56	0,00	-20,00	0,00	60,1
394	ADHEr, FBA, PFLi, TAL		4,94	0,44	16	0,00	1,28	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,49
395	ADHEr, PFLi, TAL, TPI		4,94	0,44	16	0,00	1,28	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,49
396	ADHEr, PFK, PFLi, TAL		4,94	0,44	16	0,00	1,28	0,00	0,00	-20,00	0,00	43,49
397	ADHEr, GLYCL, HEX1, THD2		4,9	0,74	22,16	0,00	-6,47	26,02	0,00	-20,00	0,00,09	56,37
398	ADHEr, GLUDy, PFK, PFLi		4,89	0,39	16,45	0,00	1,06	0,00	0,00	-20,00	0,00	44,29
399	ADHEr, GLUDy, PFLi, TPI		4,89	0,39	16,45	0,00	1,06	0,00	0,00	-20,00	0,00	44,29
400	ADHEr, FBA, GLUDy, PFLi		4,89	0,39	16,45	0,00	1,06	0,00	0,00	-20,00	0,00	44,29
401	ADHEr, EDA, PFLi, PGI		4,83	0,5	0,00	0,00	-3,17	0,00	0,00	-20,00	0,00	45,11
402	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, RPE		4,72	0,72	23,93	0,00	-4,31	27,69	0,00	-20,00	0,00	56,73
403	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, TAL		4,65	0,72	24,01	0,00	-4,47	27,8	0,00	-20,00	0,00	56,96
404	ADHEr, ATPS4r, CBMK2, RPE		4,6	0,8	22,8	0,00	-4,14	26,97	0,00	-20,00	0,00	55,45

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
405	ADHER, ATPS4r, CBMK2, GLUDy	4,57	0,72	24,19	0,00	-4,67	27,97	0,00	-20,00	0,00	57,3
406	ADHER, ATPS4r, CBMK2, TAL	4,51	0,8	22,88	0,00	-4,32	27,09	0,00	-20,00	0,00	55,69
407	ADHER, ASNS2, ATPS4r, GLU5K	4,42	0,81	22,95	0,00	-4,53	27,2	0,00	-20,00	0,00	55,93
408	ADHER, ASNS2, ATPS4r, G5SD	4,42	0,81	22,95	0,00	-4,53	27,2	0,00	-20,00	0,00	55,93
409	ADHER, ACKr, PFLi, PGI	3	0,5	3,27	0,00	-6,43	0,00	0,00	-20,00	0,00	50,4
410	ADHER, ACKr, AKGD, FRD2	2,76	1,03	3,32	0,00	14,07	0,00	0,00	-20,00	0,00	25,81
411	ADHER, ACKr, FRD2, SUOAS	1,91	1,03	2,47	0,00	12,55	0,00	0,00	-20,00	0,00	27,45
412	ADHER, FUM, G6PDHy, TAL	1,4	0,71	14,98	0,00	-12,86	18,72	0,00	-20,00	0,00	62,31
413	ADHER, FUM, PGDH, TAL	1,4	0,71	14,98	0,00	-12,86	18,72	0,00	-20,00	0,00	62,31
414	ADHER, FUM, PGL, TAL	1,4	0,71	14,98	0,00	-12,86	18,72	0,00	-20,00	0,00	62,31
415	ADHER, FUM, ME2, TPI	1,36	0,47	17,83	0,00	-14,86	20,31	0,00	-20,00	0,00	68,38
416	ADHER, FUM, ME2, PFK	1,36	0,47	17,83	0,00	-14,86	20,31	0,00	-20,00	0,00	68,38
417	ADHER, FBA, FUM, ME2	1,36	0,47	17,83	0,00	-14,86	20,31	0,00	-20,00	0,00	68,38
418	ADHER, FRD2, GLUDy, LDH_D	1,22	0,24	0,00	0,00	-33,89	3,68	33,86	-20,00	0,00	73,09
419	ADHER, FRD2, LDH_D, THD2	1,15	0,4	0,00	0,00	15,41	4,39	0,00	-20,00	0,00	22,97
420	ADHER, G6PDHy, HEX1, TAL	1,01	0,73	14,02	0,00	-13,53	17,85	0,00	-20,00	0,00	62,73
421	ADHER, HEX1, PGDH, TAL	1,01	0,73	14,02	0,00	-13,53	17,85	0,00	-20,00	0,00	62,73
422	ADHER, HEX1, PGL, TAL	1,01	0,73	14,02	0,00	-13,53	17,85	0,00	-20,00	0,00	62,73
423	ADHER, MDH, PGDH, TAL	0,89	0,65	14,71	0,00	-14,28	18,1	0,00	-20,00	0,00	64,72
424	ADHER, G6PDHy, MDH, TAL	0,89	0,65	14,71	0,00	-14,28	18,1	0,00	-20,00	0,00	64,72
425	ADHER, MDH, PGL, TAL	0,89	0,65	14,71	0,00	-14,28	18,1	0,00	-20,00	0,00	64,72
426	ADHER, PGDH, TAL, TPI	0,43	0,47	15,73	0,00	-16,28	18,18	0,00	-20,00	0,00	69,35
427	ADHER, FBA, PGDH, TAL	0,43	0,47	15,73	0,00	-16,28	18,18	0,00	-20,00	0,00	69,35
428	ADHER, PFK, PGDH, TAL	0,43	0,47	15,73	0,00	-16,28	18,18	0,00	-20,00	0,00	69,35
429	ADHER, GLYCL, TAL, TPI	0,41	0,49	15,57	0,00	-16,70	18,12	0,00	-20,00	0,00,06	69,95
430	ADHER, TAL, THD5, TPI	0,4	0,49	15,57	0,00	-16,69	18,11	0,00	-20,00	0,00	69,95
431	ADHER, LDH_D, TAL, TPI	0,4	0,49	15,57	0,00	-16,69	18,11	0,00	-20,00	0,00	69,95
432	ADHER, ASPT, EDA, MDH, PGI	16,17	0,05	8,39	0,00	11,88	24,76	0,00	-20,00	0,00	33,47
433	ADHER, ATPS4r, FRD2, LDH_D, ME2	15,11	0,23	0,00	0,00	23,25	9,12	0,00	-20,00	0,00	13,86

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
434	ADHEr, EDA, PFLi, PGI, PPCK	14,76	0,16	16,11	0,00	22,13	0,00	0,00	-20,00	0,00	17,24
435	ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, MDH	15,02	0,23	0,00	0,00	23,19	9,11	0,00	-20,00	0,00	13,93
436	ADHEr, EDA, PFLi, PGI, SUCD4	14,65	0,19	15,67	0,00	21,97	0,00	0,00	-20,00	0,00	17,05
437	ADHEr, EDA, NADH6, PFLi, PGI	14,65	0,19	15,67	0,00	21,97	0,00	0,00	-20,00	0,00	17,05
438	ADHEr, EDA, NADH6, PGI, PPCK	14,47	0,09	17,44	0,00	19,97	3,46	0,00	-20,00	0,00	21,55
439	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi	14,38	0,36	13,01	0,00	21,55	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,56
440	ADHEr, GLUDy, HEX1, PFLi, PGI	14,31	0,31	14,25	0,00	21,45	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,44
441	ADHEr, ACKr, GLCpts, NADH6, PGI	14,23	0,27	14,38	0,00	22,22	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,72
442	ADHEr, GLUDy, HEX1, NADH6, PGI	14,13	0,25	15,36	0,00	19,91	2,53	0,00	-20,00	0,00	19,65
443	ADHEr, EDA, GLUDy, NADH6, PGI	14,07	0,27	15,02	0,00	19,91	2,38	0,00	-20,00	0,00	19,34
444	ADHEr, ACKr, PFLi, PGI, SUCD4	14,04	0,19	14,14	0,00	21,04	0,00	0,00	-20,00	0,00	17,69
445	ADHEr, ACKr, NADH6, PFLi, PGI	14,04	0,19	14,14	0,00	22,14	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,6
446	ADHEr, ACKr, GLUDy, NADH6, PGI	14,03	0,3	14,19	0,00	22,02	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,65
447	ADHEr, EDA, GLCpts, NADH6, PGI	14,02	0,28	14,76	0,00	21,9	0,00	0,00	-20,00	0,00	17,17
448	ADHEr, ACKr, CBMK2, NADH6, PGI	13,94	0,34	14,12	0,00	21,89	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,54
449	ADHEr, ATPS4r, FDH2, NADH6, PGI	13,86	0,22	14,56	0,00	21,78	0,00	0,00	-20,00	0,00	17,62
450	ADHEr, ATPS4r, NADH6, PFLi, PGI	13,86	0,22	14,56	0,00	21,78	0,00	0,00	-20,00	0,00	17,62
451	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PFLi	13,8	0,27	16,36	0,00	20,68	0,00	0,00	-20,00	0,00	18,31
452	ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6, PGL	13,69	0,43	13,35	0,00	20,51	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,43
453	ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, NADH6	13,69	0,43	13,35	0,00	20,51	0,00	0,00	-20,00	0,00	16,43
454	ADHEr, ACKr, FUM, GLUDy, LDH_D	13,68	0,36	13,87	0,00	18,43	4,12	0,00	-20,00	0,00	20,56
455	ADHEr, ATPS4r, NADH6, PGI, SUCD4	13,66	0,25	15,79	0,00	19,61	3,75	0,00	-20,00	0,00	21,32
456	ADHEr, ACKr, GLUDy, LDH_D, SUCD4	13,56	0,37	13,76	0,00	17,71	5,22	0,00	-20,00	0,00	21,6
457	ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, THD2	13,53	0,44	10,63	0,00	14,18	12,16	0,00	-20,00	0,00	25,92
458	ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL, THD2	13,53	0,44	10,63	0,00	14,18	12,16	0,00	-20,00	0,00	25,92

	Transformaciones destinadas a eliminación t. t. #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
459	ADHEr, ASPT, G6PDHy, MDH, PYK	13,44	0,26	11,28	0,00	7,24	25,83	0,00	-20,00	0,00	38,92
460	ADHEr, ASPT, EDA, MDH, PYK	13,44	0,26	11,28	0,00	7,24	25,83	0,00	-20,00	0,00	38,92
461	ADHEr, ASPT, MDH, PGL, PYK	13,44	0,26	11,28	0,00	7,24	25,83	0,00	-20,00	0,00	38,92
462	ADHEr, FRD2, LDH_D, MDH, SUcoAS	13,35	0,25	4,81	0,00	13,43	19,59	0,00	-20,00	0,00	28,6
463	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, SUcoAS	13,27	0,26	4,78	0,00	13,14	19,51	0,00	-20,00	0,00	28,92
464	ADHEr, ACi6, LDH_D, MDH, SUCD4	13,22	0,26	0,00	0,00	17,54	14,32	0,00	-20,00	0,00	21,06
465	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, PGI, SUCD4	13,17	0,24	16,4	0,00	17,06	7,36	0,00	-20,00	0,00	25,48
466	ADHEr, ASPT, FUM, LDH_D, MDH	13,15	0,27	5,76	0,00	12,63	20,09	0,00	-20,00	0,00	29,76
467	ADHEr, ASPT, LDH_D, MALS, MDH	13,15	0,27	5,76	0,00	12,63	20,09	0,00	-20,00	0,00	29,76
468	ADHEr, ASPT, ICL, LDH_D, MDH	13,15	0,27	5,76	0,00	12,63	20,09	0,00	-20,00	0,00	29,76
469	ADHEr, ACi6, LDH_D, MDH, NADH6	13,07	0,51	0,00	0,00	23,45	0,00	0,00	-20,00	0,00	13,57
470	ADHEr, FRD2, GLUDy, LDH_D, PPCK	12,91	0,12	12,29	0,00	-0,02	38,75	0,00	-20,00	0,00	51,9
471	ADHEr, FRD2, LDH_D, PPCK, THD2	12,89	0,13	12,25	0,00	-0,02	38,7	0,00	-20,00	0,00	51,85
472	ADHEr, ACKr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4	12,73	0,47	12,99	0,00	16,72	6,7	0,00	-20,00	0,00	23,06
473	ADHEr, ACKr, ACS, PPC, PPCK	12,62	0,11	12,68	0,00	0,33	39,2	0,00	-20,00	0,00	52,67
474	ADHEr, GLUDy, LDH_D, PPC, PPCK	12,6	0,16	11,81	0,00	0,47	38,84	0,00	-20,00	0,00	51,79
475	ADHEr, ATPS4r, FDH2, NADH6, SULabc	12,6	0,48	14,92	0,00	19,87	0,00	0,00	-20,00	0,00	18,32
476	ADHEr, LDH_D, PPC, PPCK, THD2	12,6	0,16	11,72	0,00	0,49	38,81	0,00	-20,00	0,00	51,71
477	ADHEr, ASPT, ATPS4r, GLCpts, MDH	12,57	0,29	9,83	0,00	18,83	0,00	0,00	-20,00	0,00	18,28
478	ADHEr, G6PDHy, MDH, NADH6, THD2	12,37	0,68	7,32	0,00	24,57	2,87	0,00	-20,00	0,00	15,06
479	ADHEr, MDH, NADH6, PGL, THD2	12,37	0,68	7,32	0,00	24,57	2,87	0,00	-20,00	0,00	15,06
480	ADHEr, ACKr, FBA, GLUDy, NADH6	12,36	0,41	12,58	0,00	28,51	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,47
481	ADHEr, ACKr, GLUDy, NADH6, PFK	12,36	0,41	12,58	0,00	28,51	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,47
482	ADHEr, ACKr, GLUDy, NADH6, TPI	12,36	0,41	12,58	0,00	28,51	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,47

	Transformaciones destinadas a eliminación f, ‡, #	BDO	BIO	AC	ALA	CO2	FOR	FUM	GLC	GLY	H+
483	ADHER, ATPS4r, MTHFC, NADH6, PFLi	12,33	0,49	15,46	0,00	19,46	0,00	0,00	-20,00	0,00	18,94
484	ADHER, ATPS4r, FTHFD, NADH6, PFLi	12,33	0,49	15,46	0,00	19,46	0,00	0,00	-20,00	0,00	18,94
485	ADHER, ATPS4r, G6PDHy, GLCpts, MDH	12,3	0,34	0,00	0,00	12,96	0,00	0,00	-20,00	0,00	24,29
486	ADHER, ATPS4r, GLCpts, MDH, PGL	12,3	0,34	0,00	0,00	12,96	0,00	0,00	-20,00	0,00	24,29
487	ADHER, ACKr, FBA, GLCpts, NADH6	12,15	0,44	12,39	0,00	28,2	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,54
488	ADHER, ACKr, GLCpts, NADH6, TPI	12,15	0,44	12,39	0,00	28,2	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,54
489	ADHER, ACKr, GLCpts, NADH6, PFK	12,15	0,44	12,39	0,00	28,2	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,54
490	ADHER, ACKr, LDH_D, MDH, SUCD4	12,15	0,4	12,37	0,00	6,33	23,73	0,00	-20,00	0,00	38,94
491	ADHER, ACKr, AKGD, ATPS4r, FBA	12,13	0,22	12,25	0,00	37,66	0,00	0,00	-20,00	0,00	13,85
492	ADHER, ACKr, AKGD, ATPS4r, PFK	12,13	0,22	12,25	0,00	37,66	0,00	0,00	-20,00	0,00	13,85
493	ADHER, ACKr, AKGD, ATPS4r, TPI	12,13	0,22	12,25	0,00	12,1	25,56	0,00	-20,00	0,00	39,4
494	ADHER, ADA, PGI, PPCK, SUCD4	12,09	0,07	20,13	0,00	7,88	20,5	0,00	-20,00	0,00	41,14
495	ADHER, ACKr, ATPS4r, FBA, SUCOAS	12,09	0,23	12,21	0,00	12,27	25,58	0,00	-20,00	0,00	39,4
496	ADHER, ACKr, ATPS4r, PFK, SUCOAS	12,09	0,23	12,21	0,00	12,27	25,58	0,00	-20,00	0,00	39,4
497	ADHER, ACKr, ATPS4r, SUCOAS, TPI	12,09	0,23	12,21	0,00	37,86	0,00	0,00	-20,00	0,00	13,82
498	ADHER, FRD2, LDH_D, ME2, SUCOAS	12,08	0,26	3,82	0,00	8,14	17,37	4,03	-20,00	0,00	33,19
499	ADHER, ACKr, CBMK2, FBA, NADH6	12,06	0,46	12,31	0,00	28,06	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,57
500	ADHER, ACKr, CBMK2, NADH6, PFK	12,06	0,46	12,31	0,00	28,06	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,57
501	ADHER, ACKr, CBMK2, NADH6, TPI	12,06	0,46	12,31	0,00	28,06	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,57
502	ADHER, ACKr, NADH6, RPE, TPI	12,05	0,46	12,3	0,00	28,05	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,58
503	ADHER, ACKr, NADH6, PFK, RPE	12,05	0,46	12,3	0,00	28,05	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,58
504	ADHER, ACKr, FBA, NADH6, RPE	12,05	0,46	12,3	0,00	28,05	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,58
505	ADHER, ACKr, ASNS2, FBA, NADH6	12,05	0,46	12,3	0,00	28,04	0,00	0,00	-20,00	0,00	15,58

Tabla 7 (Cont.)

	Transformaciones metabólicas destinadas a eliminación † ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	P1	SO4	SUC	THR	VAL
1	ADHEr, NADH6	8,96	0,00	0,00	-6,26	-2,00	0,00	-0,78	-0,13	0,23	0,00	0,00
2	ADHEr, ENO	-12,07	0,00	0,00	-0,24	-2,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
3	ADHEr, PGM	-12,07	0,00	0,00	-0,24	-2,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
4	ADHEr, PPCK	-0,90	0,00	0,00	-4,96	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
5	ADHEr, SUCD4	0,68	0,00	0,00	-5,60	0,00	0,00	-0,69	-0,11	0,00	0,00	0,00
6	ADHEr, ATPS4r	6,08	0,00	0,00	-7,09	-5,00	0,00	-0,88	-0,14	0,00	0,00	0,00
7	ADHEr, PGI	21,51	0,00	0,00	-4,52	0,00	0,00	-0,56	-0,09	24,86	0,00	0,00
8	ADHEr, FUM	10,90	0,00	0,00	-6,44	0,00	0,00	-0,80	-0,13	12,16	0,00	0,00
9	ADHEr, HEX1	12,29	0,00	0,00	-6,62	0,00	0,00	-0,82	-0,13	13,54	0,00	0,00
10	ADHEr, MDH	10,81	0,00	0,00	-5,83	0,00	0,00	-0,72	-0,12	14,32	0,00	0,00
11	ADHEr, TPI	8,25	0,00	0,00	-4,23	0,00	0,00	-0,52	-0,09	16,46	0,00	0,00
12	ADHEr, FBA	8,25	0,00	0,00	-4,23	0,00	0,00	-0,52	-0,09	16,46	0,00	0,00
13	ADHEr, PFK	8,25	0,00	0,00	-4,23	0,00	0,00	-0,52	-0,09	16,46	0,00	0,00
14	ADHEr, HEX1, PGI	4,02	0,00	0,00	-3,39	0,00	0,00	-0,42	-0,07	0,00	0,00	0,00
15	ADHEr, PFLi, PPCK	14,07	0,00	0,00	-4,31	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
16	ADHEr, PFLi, SUCD4	14,87	0,00	0,00	-4,72	0,00	0,00	-0,58	-0,10	0,00	0,00	0,00
17	ADHEr, ACKr, NADH6	30,54	0,00	0,00	-7,41	-20,00	0,00	-0,92	-0,15	0,00	0,00	0,00
18	ADHEr, NADH6, PFLi	15,46	0,00	0,00	-5,03	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
19	ADHEr, NADH6, PGM	3,71	0,00	0,00	-0,73	-10,00	0,00	-0,09	-0,01	0,00	0,00	0,00
20	ADHEr, ENO, NADH6	3,71	0,00	0,00	-0,73	-10,00	0,00	-0,09	-0,01	0,00	0,00	0,00
21	ADHEr, ASPT, MDH	-1,88	0,00	0,00	-4,57	0,00	0,00	-0,57	-0,09	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones metabólicas destinadas a eliminación † #, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	P1	SO4	SUC	THR	VAL
22	ADHER, NADH6, PGI	-0,60	0,00	0,00	-3,07	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
23	ADHER, NADH6, TPI	-0,71	0,00	0,00	-3,11	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
24	ADHER, FBA, NADH6	-0,71	0,00	0,00	-3,11	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
25	ADHER, NADH6, PFK	-0,71	0,00	0,00	-3,11	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
26	ADHER, NADH6, PPCK	2,51	0,00	0,00	-4,48	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00
27	ADHER, MDH, NADH6	4,00	0,00	0,00	-5,12	0,00	0,00	-0,63	-0,10	0,00	0,00	0,00
28	ADHER, FUM, NADH6	5,55	0,00	0,00	-5,78	0,00	0,00	-0,72	-0,12	0,00	0,00	0,00
29	ADHER, PPCK, THD2	0,13	0,00	0,00	-4,83	0,00	0,00	-0,60	-0,10	0,00	0,00	0,00
30	ADHER, NADH6, RPE	13,24	0,00	0,00	-6,66	-5,00	0,00	-0,82	-0,13	0,23	0,00	0,00
31	ADHER, NADH6, TAL	12,86	0,00	0,00	-6,69	-5,00	0,00	-0,83	-0,14	0,00	0,00	0,00
32	ADHER, PGI, PPCK	-6,65	0,00	0,00	-2,62	0,00	0,00	-0,32	-0,05	0,00	0,00	0,00
33	ADHER, PGI, SUCD4	-6,10	0,00	0,00	-2,84	0,00	0,00	-0,35	-0,06	0,00	0,00	0,00
34	ADHER, ATPS4r, PPCK	1,88	0,00	0,00	-5,25	-2,00	0,00	-0,65	-0,11	0,00	0,00	0,00
35	ADHER, PFK, PPCK	-6,68	0,00	0,00	-2,66	0,00	0,00	-0,33	-0,05	0,00	0,00	0,00
36	ADHER, FBA, PPCK	-6,68	0,00	0,00	-2,66	0,00	0,00	-0,33	-0,05	0,00	0,00	0,00
37	ADHER, PPCK, TPI	-6,68	0,00	0,00	-2,66	0,00	0,00	-0,33	-0,05	0,00	0,00	0,00
38	ADHER, FBA, HEX1	-6,39	0,00	0,00	-2,77	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
39	ADHER, HEX1, PFK	-6,39	0,00	0,00	-2,77	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
40	ADHER, HEX1, TPI	-6,39	0,00	0,00	-2,77	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
41	ADHER, MDH, THD2	8,45	0,00	0,00	-5,39	0,00	0,00	-0,67	-0,11	6,20	0,00	0,00
42	ADHER, SUCD4, TPI	-6,13	0,00	0,00	-2,88	0,00	0,00	-0,36	-0,06	0,00	0,00	0,00
43	ADHER, FBA, SUCD4	-6,13	0,00	0,00	-2,88	0,00	0,00	-0,36	-0,06	0,00	0,00	0,00
44	ADHER, PFK, SUCD4	-6,13	0,00	0,00	-2,88	0,00	0,00	-0,36	-0,06	0,00	0,00	0,00
45	ADHER, FUM, PFLi	19,66	0,00	0,00	-6,02	0,00	0,00	-0,75	-0,12	7,94	0,00	0,00
46	ADHER, PPCK, SUCD4	-3,22	0,00	0,00	-4,04	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
47	ADHER, PPCK, RPE	-0,76	0,00	0,00	-4,95	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
48	ADHER, GLCpts, PPCK	-2,34	0,00	0,00	-4,39	0,00	0,00	-0,54	-0,09	0,00	0,00	0,00
49	ADHER, GLUDy, MDH	-2,29	0,00	0,00	-4,41	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00
50	ADHER, GLUDy, PPCK	-2,13	0,00	0,00	-4,47	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones metabólicas destinadas a eliminación † #, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	P1	SO4	SUC	THR	VAL
51	ADHEr, MDH, SUCD4	-1,81	0,00	0,00	-4,60	0,00	0,00	-0,57	-0,09	0,00	0,00	0,00
52	ADHEr, PPCK, TAL	-0,83	0,00	0,00	-4,95	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
53	ADHEr, FUM, PPCK	-1,66	0,00	0,00	-4,66	0,00	0,00	-0,58	-0,09	0,00	0,00	0,00
54	ADHEr, MDH, PPCK	-1,66	0,00	0,00	-4,66	0,00	0,00	-0,58	-0,09	0,00	0,00	0,00
55	ADHEr, RPE, SUCD4	0,74	0,00	0,00	-5,54	0,00	0,00	-0,69	-0,11	0,00	0,00	0,00
56	ADHEr, ME2, SUCD4	-1,01	0,00	0,00	-4,92	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
57	ADHEr, FUM, GLUDy	-0,80	0,00	0,00	-5,00	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
58	ADHEr, GLUDy, SUCD4	-0,78	0,00	0,00	-5,01	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
59	ADHEr, GLCpts, SUCD4	-0,69	0,00	0,00	-5,05	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
60	ADHEr, SUCD4, TAL	0,71	0,00	0,00	-5,56	0,00	0,00	-0,69	-0,11	0,00	0,00	0,00
61	ADHEr, FUM, SUCD4	0,30	0,00	0,00	-5,44	0,00	0,00	-0,67	-0,11	0,00	0,00	0,00
62	ADHEr, HEX1, SUCD4	0,47	0,00	0,00	-5,51	0,00	0,00	-0,68	-0,11	0,00	0,00	0,00
63	ADHEr, CBMK2, SUCD4	0,56	0,00	0,00	-5,55	0,00	0,00	-0,69	-0,11	0,00	0,00	0,00
64	ADHEr, FUM, HEX1	1,94	0,00	0,00	-6,10	0,00	0,00	-0,75	-0,12	0,00	0,00	0,00
65	ADHEr, HEX1, PFLi	20,54	0,00	0,00	-6,25	0,00	0,00	-0,77	-0,13	9,44	0,00	0,00
66	ADHEr, ATPS4r, PGI	-0,22	0,00	0,00	-4,49	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
67	ADHEr, ATPS4r, FBA	-0,25	0,00	0,00	-4,56	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
68	ADHEr, ATPS4r, PFK	-0,25	0,00	0,00	-4,56	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
69	ADHEr, ATPS4r, TPI	-0,25	0,00	0,00	-4,56	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
70	ADHEr, PFLi, TPI	16,61	0,00	0,00	-3,82	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,23	0,00	0,00
71	ADHEr, PFK, PFLi	16,61	0,00	0,00	-3,82	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,23	0,00	0,00
72	ADHEr, FBA, PFLi	16,61	0,00	0,00	-3,82	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,23	0,00	0,00
73	ADHEr, HEX1, THD2	3,70	0,00	0,00	-6,40	0,00	0,00	-0,79	-0,13	1,51	0,00	0,00
74	ADHEr, ATPS4r, RPE	6,06	0,00	0,00	-6,97	-5,00	0,00	-0,86	-0,14	0,00	0,00	0,00
75	ADHEr, ATPS4r, GLUDy	4,14	0,00	0,00	-6,31	-5,00	0,00	-0,78	-0,13	0,00	0,00	0,00
76	ADHEr, ATPS4r, TAL	6,07	0,00	0,00	-7,03	-5,00	0,00	-0,87	-0,14	0,00	0,00	0,00
77	ADHEr, ATPS4r, CBMK2	5,91	0,00	0,00	-7,02	-5,00	0,00	-0,87	-0,14	0,00	0,00	0,00
78	ADHEr, EDA, PGI	20,66	0,00	0,00	-4,37	0,00	0,00	-0,54	-0,09	21,30	0,00	0,00
79	ADHEr, PFLi, PGI	22,80	0,00	0,00	-4,46	0,00	0,00	-0,55	-0,09	24,28	0,00	0,00

	Transformaciones metabólicas destinadas a eliminación † #, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	P1	SO4	SUC	THR	VAL
80	ADHEr, MDH, PFK	5,91	0,00	0,00	-4,11	0,00	0,00	-0,51	-0,08	13,43	0,00	0,00
81	ADHEr, MDH, TPI	5,91	0,00	0,00	-4,11	0,00	0,00	-0,51	-0,08	13,43	0,00	0,00
82	ADHEr, FBA, MDH	5,91	0,00	0,00	-4,11	0,00	0,00	-0,51	-0,08	13,43	0,00	0,00
83	ADHEr, HEX1, RPE	12,13	0,00	0,00	-6,59	0,00	0,00	-0,82	-0,13	13,08	0,00	0,00
84	ADHEr, MDH, RPE	10,68	0,00	0,00	-5,80	0,00	0,00	-0,72	-0,12	13,90	0,00	0,00
85	ADHEr, HEX1, TAL	12,21	0,00	0,00	-6,61	0,00	0,00	-0,82	-0,13	13,30	0,00	0,00
86	ADHEr, MDH, TAL	10,74	0,00	0,00	-5,81	0,00	0,00	-0,72	-0,12	14,10	0,00	0,00
87	ADHEr, RPE, TPI	8,23	0,00	0,00	-4,19	0,00	0,00	-0,52	-0,08	16,35	0,00	0,00
88	ADHEr, PFK, RPE	8,23	0,00	0,00	-4,19	0,00	0,00	-0,52	-0,08	16,35	0,00	0,00
89	ADHEr, FBA, RPE	8,23	0,00	0,00	-4,19	0,00	0,00	-0,52	-0,08	16,35	0,00	0,00
90	ADHEr, PFK, TAL	8,24	0,00	0,00	-4,21	0,00	0,00	-0,52	-0,09	16,41	0,00	0,00
91	ADHEr, FBA, TAL	8,24	0,00	0,00	-4,21	0,00	0,00	-0,52	-0,09	16,41	0,00	0,00
92	ADHEr, HEX1, PFLi, PGI	13,38	0,00	0,00	-2,97	0,00	0,00	-0,37	-0,06	0,00	0,00	0,00
93	ADHEr, HEX1, NADH6, PGI	10,91	0,00	0,00	-2,40	0,00	0,00	-0,30	-0,05	0,00	0,00	0,00
94	ADHEr, EDA, NADH6, PGI	11,52	0,00	0,00	-2,66	0,00	0,00	-0,33	-0,05	0,00	0,00	0,00
95	ADHEr, ACKr, NADH6, PGI	14,23	0,00	0,00	-2,97	-2,00	0,00	-0,37	-0,06	0,00	0,00	0,00
96	ADHEr, FRD2, LDH_D, MDH	6,78	2,14	0,00	-4,35	0,00	0,00	-0,27	-0,04	0,00	0,00	0,00
97	ADHEr, ATPS4r, PGI, SUCD4	9,08	0,00	0,00	-2,36	-2,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
98	ADHEr, ATPS4r, FDH2, NADH6	16,09	0,00	0,00	-4,23	-2,00	0,00	-0,52	-0,09	0,00	0,00	0,00
99	ADHEr, ACKr, NADH6, TPI	24,49	0,00	0,00	-4,01	-20,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
100	ADHEr, ACKr, FBA, NADH6	24,49	0,00	0,00	-4,01	-20,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
101	ADHEr, ACKr, NADH6, PFK	24,49	0,00	0,00	-4,01	-20,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
102	ADHEr, FRD2, LDH_D, ME2	10,90	1,81	0,00	-4,09	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
103	ADHEr, HEX1, PGI, PPCK	0,36	0,00	0,00	-1,93	0,00	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
104	ADHEr, EDA, PGI, PPCK	0,38	0,00	0,00	-1,94	0,00	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
105	ADHEr, HEX1, PGI, SUCD4	1,01	0,00	0,00	-2,19	0,00	0,00	-0,27	-0,04	0,00	0,00	0,00
106	ADHEr, EDA, PGI, SUCD4	1,07	0,00	0,00	-2,21	0,00	0,00	-0,27	-0,04	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	metabólicas	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
107	ADHER, ATPS4r, EDA, PGI		2,80	0,00	0,00	-2,91	0,00	0,00	-0,36	-0,06	0,00	0,00	0,00
108	ADHER, GLUDy, HEX1, PGI		3,17	0,00	0,00	-3,05	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
109	ADHER, MDH, PGL, THD2		2,41	0,00	0,00	-4,15	0,00	0,00	-0,51	-0,08	0,00	0,00	0,00
110	ADHER, G6PDHy, MDH, THD2		2,41	0,00	0,00	-4,15	0,00	0,00	-0,51	-0,08	0,00	0,00	0,00
111	ADHER, PFLi, PGI, PPCK		9,09	0,00	0,00	-1,73	0,00	0,00	-0,21	-0,03	0,00	0,00	0,00
112	ADHER, PFLi, PPCK, TPI		9,11	0,00	0,00	-1,75	0,00	0,00	-0,22	-0,04	0,00	0,00	0,00
113	ADHER, FBA, PFLi, PPCK		9,11	0,00	0,00	-1,75	0,00	0,00	-0,22	-0,04	0,00	0,00	0,00
114	ADHER, PFK, PFLi, PPCK		9,11	0,00	0,00	-1,75	0,00	0,00	-0,22	-0,04	0,00	0,00	0,00
115	ADHER, ACKr, MDH, NADH6		26,42	0,00	0,00	-6,41	-15,00	0,00	-0,79	-0,13	0,00	0,00	0,00
116	ADHER, NADH6, PFLi, PGI		9,59	0,00	0,00	-1,99	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
117	ADHER, PFLi, PGI, SUCD4		9,59	0,00	0,00	-1,99	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
118	ADHER, FBA, PFLi, SUCD4		9,62	0,00	0,00	-2,01	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
119	ADHER, PFK, PFLi, SUCD4		9,62	0,00	0,00	-2,01	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
120	ADHER, NADH6, PFK, PFLi		9,62	0,00	0,00	-2,01	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
121	ADHER, FBA, NADH6, PFLi		9,62	0,00	0,00	-2,01	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
122	ADHER, PFLi, SUCD4, TPI		9,62	0,00	0,00	-2,01	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
123	ADHER, NADH6, PFLi, TPI		9,62	0,00	0,00	-2,01	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
124	ADHER, HEX1, PFK, PFLi		9,67	0,00	0,00	-2,04	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
125	ADHER, FBA, HEX1, PFLi		9,67	0,00	0,00	-2,04	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
126	ADHER, HEX1, PFLi, TPI		9,67	0,00	0,00	-2,04	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
127	ADHER, PFLi, PPCK, THD2		14,16	0,00	0,00	-4,23	0,00	0,00	-0,52	-0,09	0,00	0,00	0,00
128	ADHER, ACKr, GLUDy, NADH6		28,93	0,00	0,00	-6,51	-20,00	0,00	-0,81	-0,13	0,00	0,00	0,00
129	ADHER, ACKr,		29,25	0,00	0,00	-6,68	-20,00	0,00	-0,83	-0,14	0,00	0,00	0,00
130	ADHER, ACKr, AKGD, ATPS4r		12,00	0,00	0,00	-4,99	-15,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
131	ADHER, ATPS4r, NADH6, PFLi		14,83	0,00	1,08	-4,62	0,00	0,00	-0,57	-0,09	0,00	0,00	0,00
132	ADHER, GLCpts, PFLi, PPCK		12,93	0,00	0,00	-3,72	0,00	0,00	-0,46	-0,08	0,00	0,00	0,00
133	ADHER, ACKr, ATPS4r, SUCOAS		11,13	0,00	0,00	-5,03	-14,78	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
134	ADHEr, ACKr, ME2, NADH6	27,22	0,00	0,00	-6,69	-15,00	0,00	-0,83	-0,14	1,08	0,00	0,00
135	ADHEr, GLUDy, PFLi, PPCK	13,23	0,00	0,00	-3,87	0,00	0,00	-0,48	-0,08	0,00	0,00	0,00
136	ADHEr, ME2, PFLi, SUCD4	13,54	0,00	0,00	-4,03	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
137	ADHEr, MDH, NADH6, PFLi	13,59	0,00	0,00	-4,06	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
138	ADHEr, PFLi, PPCK, RPE	14,08	0,00	0,00	-4,30	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
139	ADHEr, PFLi, PPCK, TAL	14,07	0,00	0,00	-4,30	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
140	ADHEr, GLUDy, PFLi, SUCD4	13,88	0,00	0,00	-4,21	0,00	0,00	-0,52	-0,09	0,00	0,00	0,00
141	ADHEr, CBMK2, PFLi, PPCK	13,99	0,00	0,00	-4,27	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
142	ADHEr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4	16,33	0,00	0,00	-4,91	-2,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
143	ADHEr, PFLi, RPE, SUCD4	14,82	0,00	0,00	-4,67	0,00	0,00	-0,58	-0,09	0,00	0,00	0,00
144	ADHEr, ACKr, CBMK2, NADH6	30,40	0,00	0,00	-7,33	-20,00	0,00	-0,91	-0,15	0,00	0,00	0,00
145	ADHEr, PFLi, SUCD4, TAL	14,84	0,00	0,00	-4,70	0,00	0,00	-0,58	-0,09	0,00	0,00	0,00
146	ADHEr, ACKr, NADH6, RPE	30,41	0,00	0,00	-7,34	-20,00	0,00	-0,91	-0,15	0,00	0,00	0,00
147	ADHEr, ACKr, FUM, NADH6	30,45	0,00	0,00	-7,36	-20,00	0,00	-0,91	-0,15	0,00	0,00	0,00
148	ADHEr, ACKr, NADH6, TAL	30,47	0,00	0,00	-7,37	-20,00	0,00	-0,91	-0,15	0,00	0,00	0,00
149	ADHEr, ACKr, ASNS2, NADH6	30,48	0,00	0,00	-7,38	-20,00	0,00	-0,91	-0,15	0,00	0,00	0,00
150	ADHEr, CBMK2, PFLi, SUCD4	14,78	0,00	0,00	-4,68	0,00	0,00	-0,58	-0,09	0,00	0,00	0,00
151	ADHEr, ACKr, NADH12, NADH6	30,49	0,00	0,00	-7,38	-20,00	0,00	-0,91	-0,15	0,00	0,00	0,00
152	ADHEr, ACKr, NADH6, SO4t2	30,51	0,00	0,00	-7,39	-20,00	0,00	-0,91	-0,15	0,00	0,00	0,00
153	ADHEr, NADH12, NADH6, PFLi	14,87	0,00	0,00	-4,72	0,00	0,00	-0,58	-0,10	0,00	0,00	0,00
154	ADHEr, FUM, NADH6, PFLi	14,89	0,00	0,00	-4,73	0,00	0,00	-0,59	-0,10	0,00	0,00	0,00
155	ADHEr, ACKr, PGI, SUCD4	12,62	0,00	0,00	-6,04	0,00	0,00	-0,23	-0,04	1,94	0,00	4,15
156	ADHEr, NADH6, PFLi, TAL	15,43	0,00	0,00	-5,00	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
157	ADHEr, CBMK2, NADH6, PFLi	15,37	0,00	0,00	-4,98	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
158	ADHEr, FUM, HEX1, PFLi	16,32	0,00	0,00	-5,47	0,00	0,00	-0,68	-0,11	0,00	0,00	0,00
159	ADHEr, MDH, NADH6, THD2	8,10	0,00	0,00	-4,75	0,00	0,00	-0,59	-0,10	0,00	0,00	0,00
160	ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6	8,00	0,00	0,00	-4,76	0,00	0,00	-0,59	-0,10	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
161	ADHer, ATPS4r, FUM, NADH6	14,08	0,00	0,00	-5,43	0,00	0,00	-0,67	-0,11	0,00	0,00	0,00
162	ADHer, ATPS4r, PGI, PPCK	-3,19	0,00	0,00	-2,28	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
163	ADHer, ASPT, MDH, NADH6	0,03	0,00	0,00	-4,13	0,00	0,00	-0,51	-0,08	0,00	0,00	0,00
164	ADHer, ATPS4r, NADH6, PPCK	6,46	0,00	0,00	-4,15	0,00	0,00	-0,51	-0,08	0,00	0,00	0,00
165	ADHer, ASPT, MDH, THD2	-1,24	0,00	0,00	-4,34	0,00	0,00	-0,54	-0,09	0,00	0,00	0,00
166	ADHer, ATPS4r, GLCpts, SUCD4	17,57	0,00	0,00	-5,62	-5,00	0,00	-0,70	-0,11	0,00	0,00	0,00
167	ADHer, ASPT, MDH, PGI	-8,18	0,00	0,00	-2,02	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
168	ADHer, ASPT, FBA, MDH	-8,17	0,00	0,00	-2,06	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
169	ADHer, ASPT, MDH, PFK	-8,17	0,00	0,00	-2,06	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
170	ADHer, ASPT, MDH, TPI	-8,17	0,00	0,00	-2,06	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
171	ADHer, ATPS4r, PFK, PPCK	0,48	0,00	0,00	-2,25	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
172	ADHer, ATPS4r, FBA, PPCK	0,48	0,00	0,00	-2,25	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
173	ADHer, ATPS4r, PPCK, TPI	0,48	0,00	0,00	-2,25	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
174	ADHer, ACKr, EDA, PGI	11,87	0,00	0,00	-3,90	0,00	0,00	-0,48	-0,08	9,88	0,00	0,00
175	ADHer, ATPS4r, HEX1, NADH6	11,00	0,00	0,00	-5,78	0,00	0,00	-0,72	-0,12	0,00	0,00	0,00
176	ADHer, NADH6, PPCK, THD2	3,90	0,00	0,00	-4,30	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
177	ADHer, ATPS4r, GLUDy, MDH	0,51	0,00	0,00	-3,99	0,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
178	ADHer, ATPS4r, MDH, PPCK	1,11	0,00	0,00	-4,22	0,00	0,00	-0,52	-0,09	0,00	0,00	0,00
179	ADHer, ATPS4r, FUM, PPCK	1,11	0,00	0,00	-4,22	0,00	0,00	-0,52	-0,09	0,00	0,00	0,00
180	ADHer, ENO, NADH6, RPE	3,75	0,00	0,00	-0,73	-10,00	0,00	-0,09	-0,01	0,00	0,00	0,00
181	ADHer, NADH6, PGM, RPE	3,75	0,00	0,00	-0,73	-10,00	0,00	-0,09	-0,01	0,00	0,00	0,00
182	ADHer, NADH6, PGM, TAL	3,73	0,00	0,00	-0,73	-10,00	0,00	-0,09	-0,01	0,00	0,00	0,00
183	ADHer, ENO, NADH6, TAL	3,73	0,00	0,00	-0,73	-10,00	0,00	-0,09	-0,01	0,00	0,00	0,00
184	ADHer, ASPT, GLCpts, MDH	-3,46	0,00	0,00	-3,94	0,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
185	ADHer, ASPT, MDH, RPE	-1,79	0,00	0,00	-4,54	0,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
186	ADHer, ASPT, GLUDy, MDH	-3,11	0,00	0,00	-4,08	0,00	0,00	-0,51	-0,08	0,00	0,00	0,00
187	ADHer, ME2, NADH6, THD2	27,21	0,00	0,00	-7,53	-15,00	0,00	-0,93	-0,15	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación 1, 2, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
188	ADHER, ME2, SUCD4, THD2	0,98	0,00	0,00	-4,53	0,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
189	ADHER, ASPT, MDH, TAL	-1,83	0,00	0,00	-4,56	0,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
190	ADHER, NADH6, PGI, PPCK	-3,12	0,00	0,00	-2,02	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
191	ADHER, FUM, PPCK, THD2	0,18	0,00	0,00	-4,28	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
192	ADHER, MDH, PPCK, THD2	0,18	0,00	0,00	-4,28	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
193	ADHER, GLUDy, MDH, THD2	-0,44	0,00	0,00	-4,05	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
194	ADHER, ASPT, CBMK2, MDH	-1,99	0,00	0,00	-4,53	0,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
195	ADHER, ATPS4r, FBA, SUCD4	7,01	0,00	0,00	-3,62	-5,00	0,00	-0,45	-0,07	0,00	0,00	0,00
196	ADHER, ATPS4r, PFK, SUCD4	7,01	0,00	0,00	-3,62	-5,00	0,00	-0,45	-0,07	0,00	0,00	0,00
197	ADHER, ATPS4r, SUCD4, TPI	7,01	0,00	0,00	-3,62	-5,00	0,00	-0,45	-0,07	0,00	0,00	0,00
198	ADHER, FBA, NADH6, PPCK	-3,17	0,00	0,00	-2,06	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
199	ADHER, NADH6, PFK, PPCK	-3,17	0,00	0,00	-2,06	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
200	ADHER, NADH6, PPCK, TPI	-3,17	0,00	0,00	-2,06	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
201	ADHER, HEX1, PFLi, THD2	19,49	0,00	0,00	-6,01	0,00	0,00	-0,74	-0,12	6,13	0,00	0,00
202	ADHER, HEX1, NADH6, PFK	-2,76	0,00	0,00	-2,23	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
203	ADHER, FBA, HEX1, NADH6	-2,76	0,00	0,00	-2,23	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
204	ADHER, HEX1, NADH6, TPI	-2,76	0,00	0,00	-2,23	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
205	ADHER, ATPS4r, G6PDHy, MDH	18,41	0,00	0,00	-4,99	0,00	0,00	-0,62	-0,10	8,31	0,00	0,00
206	ADHER, ATPS4r, MDH, PGL	18,41	0,00	0,00	-4,99	0,00	0,00	-0,62	-0,10	8,31	0,00	0,00
207	ADHER, GLUDy, NADH6, PGI	-1,39	0,00	0,00	-2,74	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
208	ADHER, ACKr, FRD2, LDH_D	26,90	0,00	0,00	-9,46	-20,00	0,00	-1,04	-0,17	0,00	0,00	1,06
209	ADHER, ACKr, LDH_D, SUCD4	26,90	0,00	0,00	-10,53	-20,00	0,00	-1,04	-0,17	0,00	0,00	0,00
210	ADHER, ATPS4r, FUM, GLUDy	4,95	0,00	0,00	-4,66	0,00	0,00	-0,58	-0,09	0,00	0,00	0,00
211	ADHER, NADH6, PFK, RPE	-0,62	0,00	0,00	-3,08	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
212	ADHER, FBA, NADH6, RPE	-0,62	0,00	0,00	-3,08	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
213	ADHER, NADH6, RPE, TPI	-0,62	0,00	0,00	-3,08	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
214	ADHER, FBA, GLUDy, NADH6	-1,50	0,00	0,00	-2,77	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
215	ADHEr, GLUDy, NADH6, PFK	-1,50	0,00	0,00	-2,77	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
216	ADHEr, GLUDy, NADH6, TPI	-1,50	0,00	0,00	-2,77	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
217	ADHEr, ATPS4r, FUM, HEX1	5,75	0,00	0,00	-5,74	0,00	0,00	-0,71	-0,12	0,00	0,00	0,00
218	ADHEr, NADH6, TAL, TPI	-0,66	0,00	0,00	-3,09	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
219	ADHEr, NADH6, PFK, TAL	-0,66	0,00	0,00	-3,09	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
220	ADHEr, FBA, NADH6, TAL	-0,66	0,00	0,00	-3,09	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
221	ADHEr, ATPS4r, MDH, THD2	4,01	0,00	0,00	-5,35	0,00	0,00	-0,66	-0,11	1,04	0,00	0,00
222	ADHEr, GLUDy, MDH, NADH6	1,07	0,00	0,00	-3,87	0,00	0,00	-0,48	-0,08	0,00	0,00	0,00
223	ADHEr, GLCpts, NADH6, PPCK	1,14	0,00	0,00	-3,90	0,00	0,00	-0,48	-0,08	0,00	0,00	0,00
224	ADHEr, NADH6, PPCK, RPE	2,70	0,00	0,00	-4,46	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00
225	ADHEr, GLUDy, NADH6, PPCK	1,46	0,00	0,00	-4,03	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
226	ADHEr, FUM, NADH6, PPCK	1,61	0,00	0,00	-4,10	0,00	0,00	-0,51	-0,08	0,00	0,00	0,00
227	ADHEr, MDH, NADH6, PPCK	1,61	0,00	0,00	-4,10	0,00	0,00	-0,51	-0,08	0,00	0,00	0,00
228	ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D	27,21	0,00	0,00	-13,29	-2,00	0,00	-0,35	-0,06	0,00	0,00	10,48
229	ADHEr, NADH6, PPCK, TAL	2,61	0,00	0,00	-4,47	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00
230	ADHEr, FUM, GLUDy, NADH6	2,48	0,00	0,00	-4,47	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00
231	ADHEr, GLCpts, MDH, NADH6	2,59	0,00	0,00	-4,52	0,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
232	ADHEr, MDH, NADH6, RPE	4,24	0,00	0,00	-5,10	0,00	0,00	-0,63	-0,10	0,00	0,00	0,00
233	ADHEr, MDH, NADH6, TAL	4,13	0,00	0,00	-5,11	0,00	0,00	-0,63	-0,10	0,00	0,00	0,00
234	ADHEr, HEX1, NADH6, THD2	27,21	0,00	0,00	-7,98	-15,00	0,00	-0,99	-0,16	0,00	0,00	0,00
235	ADHEr, FUM, NADH6, RPE	5,73	0,00	0,00	-5,72	0,00	0,00	-0,71	-0,12	0,00	0,00	0,00
236	ADHEr, CBMK2, MDH, NADH6	3,90	0,00	0,00	-5,08	0,00	0,00	-0,63	-0,10	0,00	0,00	0,00
237	ADHEr, FUM, ME2, NADH6	4,00	0,00	0,00	-5,12	0,00	0,00	-0,63	-0,10	0,00	0,00	0,00
238	ADHEr, FUM, NADH6, TAL	5,65	0,00	0,00	-5,75	0,00	0,00	-0,71	-0,12	0,00	0,00	0,00
239	ADHEr, ATPS4r, MDH, PGDH	17,83	0,00	0,00	-5,22	0,00	0,00	-0,65	-0,11	7,01	0,00	0,00
240	ADHEr, FUM, HEX1, NADH6	5,22	0,00	0,00	-5,64	0,00	0,00	-0,70	-0,11	0,00	0,00	0,00
241	ADHEr, CBMK2, FUM, NADH6	5,43	0,00	0,00	-5,73	0,00	0,00	-0,71	-0,12	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación †, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
242	ADHer, GLQpts, PPCK, THD2	-1,43	0,00	0,00	-4,27	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
243	ADHer, GLUDy, PPCK, THD2	-1,17	0,00	0,00	-4,36	0,00	0,00	-0,54	-0,09	0,00	0,00	0,00
244	ADHer, CBMK2, NADH6, TAL	12,72	0,00	0,00	-6,63	-5,00	0,00	-0,82	-0,13	0,00	0,00	0,00
245	ADHer, ATPS4r, MDH, TAL	18,04	0,00	0,00	-5,25	0,00	0,00	-0,65	-0,11	7,45	0,00	0,00
246	ADHer, ATPS4r, GLUDy, NADH6	8,28	0,00	0,00	-5,60	-2,00	0,00	-0,69	-0,11	0,97	0,00	0,00
247	ADHer, PGI, PPCK, SUCD4	-8,37	0,00	0,00	-1,95	0,00	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
248	ADHer, ATPS4r, MDH, RPE	18,24	0,00	0,00	-5,28	0,00	0,00	-0,65	-0,11	7,87	0,00	0,00
249	ADHer, FBP, PGM, THD2	-12,02	0,00	0,00	-0,23	-2,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
250	ADHer, ENO, FBP, THD2	-12,02	0,00	0,00	-0,23	-2,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
251	ADHer, FBA, PGM, THD2	-12,02	0,00	0,00	-0,23	-2,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
252	ADHer, ENO, FBA, THD2	-12,02	0,00	0,00	-0,23	-2,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
253	ADHer, ENO, THD2, TPI	-12,02	0,00	0,00	-0,23	-2,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
254	ADHer, PGM, THD2, TPI	-12,02	0,00	0,00	-0,23	-2,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
255	ADHer, GLQpts, PGI, PPCK	-7,58	0,00	0,00	-2,25	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
256	ADHer, FBA, HEX1, PPCK	-8,47	0,00	0,00	-1,94	0,00	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
257	ADHer, HEX1, PFK, PPCK	-8,47	0,00	0,00	-1,94	0,00	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
258	ADHer, HEX1, PPCK, TPI	-8,47	0,00	0,00	-1,94	0,00	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
259	ADHer, PPCK, SUCD4, TPI	-8,37	0,00	0,00	-1,98	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
260	ADHer, PFK, PPCK, SUCD4	-8,37	0,00	0,00	-1,98	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
261	ADHer, FBA, PPCK, SUCD4	-8,37	0,00	0,00	-1,98	0,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,00
262	ADHer, GLUDy, PGI, PPCK	-7,35	0,00	0,00	-2,35	0,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
263	ADHer, GLQpts, PGI, SUCD4	-7,06	0,00	0,00	-2,46	0,00	0,00	-0,30	-0,05	0,00	0,00	0,00
264	ADHer, FUM, GLUDy, PGI	-7,03	0,00	0,00	-2,47	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
265	ADHer, GLUDy, MDH, PGI	-7,03	0,00	0,00	-2,47	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
266	ADHer, FBA, HEX1, SUCD4	-8,02	0,00	0,00	-2,12	0,00	0,00	-0,26	-0,04	0,00	0,00	0,00
267	ADHer, HEX1, SUCD4, TPI	-8,02	0,00	0,00	-2,12	0,00	0,00	-0,26	-0,04	0,00	0,00	0,00
268	ADHer, HEX1, PFK, SUCD4	-8,02	0,00	0,00	-2,12	0,00	0,00	-0,26	-0,04	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación f, t, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
269	ADHer, GLUDy, PGI, SUCD4	-6,88	0,00	0,00	-2,53	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
270	ADHer, FUM, HEX1, THD2	2,71	0,00	0,00	-5,93	0,00	0,00	-0,73	-0,12	0,00	0,00	0,00
271	ADHer, FBA, GLCpts, PPCK	-7,61	0,00	0,00	-2,29	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
272	ADHer, GLCpts, PFK, PPCK	-7,61	0,00	0,00	-2,29	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
273	ADHer, GLCpts, PPCK, TPI	-7,61	0,00	0,00	-2,29	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	0,00
274	ADHer, PFK, PPCK, RPE	-6,66	0,00	0,00	-2,63	0,00	0,00	-0,32	-0,05	0,00	0,00	0,00
275	ADHer, PPCK, RPE, TPI	-6,66	0,00	0,00	-2,63	0,00	0,00	-0,32	-0,05	0,00	0,00	0,00
276	ADHer, FBA, PPCK, RPE	-6,66	0,00	0,00	-2,63	0,00	0,00	-0,32	-0,05	0,00	0,00	0,00
277	ADHer, GLUDy, PFK, PPCK	-7,38	0,00	0,00	-2,38	0,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
278	ADHer, GLUDy, PPCK, TPI	-7,38	0,00	0,00	-2,38	0,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
279	ADHer, FBA, GLUDy, PPCK	-7,38	0,00	0,00	-2,38	0,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
280	ADHer, ATPS4r, ME2, THD2	4,44	0,00	0,00	-6,13	-2,00	0,00	-0,76	-0,12	0,00	0,00	0,00
281	ADHer, HEX1, PFK, RPE	-6,36	0,00	0,00	-2,74	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
282	ADHer, HEX1, RPE, TPI	-6,36	0,00	0,00	-2,74	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
283	ADHer, FBA, HEX1, RPE	-6,36	0,00	0,00	-2,74	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
284	ADHer, FBA, PPCK, TAL	-6,67	0,00	0,00	-2,64	0,00	0,00	-0,33	-0,05	0,00	0,00	0,00
285	ADHer, PPCK, TAL, TPI	-6,67	0,00	0,00	-2,64	0,00	0,00	-0,33	-0,05	0,00	0,00	0,00
286	ADHer, PFK, PPCK, TAL	-6,67	0,00	0,00	-2,64	0,00	0,00	-0,33	-0,05	0,00	0,00	0,00
287	ADHer, ATPS4r, GLUDy, PPCK	0,48	0,00	0,00	-4,75	-2,00	0,00	-0,59	-0,10	0,00	0,00	0,00
288	ADHer, FBA, GLUDy, HEX1	-7,10	0,00	0,00	-2,49	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
289	ADHer, GLUDy, HEX1, TPI	-7,10	0,00	0,00	-2,49	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
290	ADHer, GLUDy, HEX1, PFK	-7,10	0,00	0,00	-2,49	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
291	ADHer, GLCpts, SUCD4, TPI	-7,09	0,00	0,00	-2,49	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
292	ADHer, FBA, GLCpts, SUCD4	-7,09	0,00	0,00	-2,49	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
293	ADHer, GLCpts, PFK, SUCD4	-7,09	0,00	0,00	-2,49	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
294	ADHer, GLUDy, MDH, PFK	-7,06	0,00	0,00	-2,50	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
295	ADHer, FBA, GLUDy, MDH	-7,06	0,00	0,00	-2,50	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación †, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
296	ADHER, FBA, FUM, GLUDy	-7,06	0,00	0,00	-2,50	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
297	ADHER, FUM, GLUDy, PFK	-7,06	0,00	0,00	-2,50	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
298	ADHER, GLUDy, MDH, TPI	-7,06	0,00	0,00	-2,50	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
299	ADHER, FUM, GLUDy, TPI	-7,06	0,00	0,00	-2,50	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
300	ADHER, RPE, SUCD4, TPI	-6,11	0,00	0,00	-2,84	0,00	0,00	-0,35	-0,06	0,00	0,00	0,00
301	ADHER, PFK, RPE, SUCD4	-6,11	0,00	0,00	-2,84	0,00	0,00	-0,35	-0,06	0,00	0,00	0,00
302	ADHER, FBA, RPE, SUCD4	-6,11	0,00	0,00	-2,84	0,00	0,00	-0,35	-0,06	0,00	0,00	0,00
303	ADHER, GLUDy, PFK, SUCD4	-6,91	0,00	0,00	-2,56	0,00	0,00	-0,32	-0,05	0,00	0,00	0,00
304	ADHER, FBA, GLUDy, SUCD4	-6,91	0,00	0,00	-2,56	0,00	0,00	-0,32	-0,05	0,00	0,00	0,00
305	ADHER, GLUDy, SUCD4, TPI	-6,91	0,00	0,00	-2,56	0,00	0,00	-0,32	-0,05	0,00	0,00	0,00
306	ADHER, HEX1, PFK, TAL	-6,37	0,00	0,00	-2,76	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
307	ADHER, FBA, HEX1, TAL	-6,37	0,00	0,00	-2,76	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
308	ADHER, HEX1, TAL, TPI	-6,37	0,00	0,00	-2,76	0,00	0,00	-0,34	-0,06	0,00	0,00	0,00
309	ADHER, PFK, SUCD4, TAL	-6,12	0,00	0,00	-2,86	0,00	0,00	-0,35	-0,06	0,00	0,00	0,00
310	ADHER, FBA, SUCD4, TAL	-6,12	0,00	0,00	-2,86	0,00	0,00	-0,35	-0,06	0,00	0,00	0,00
311	ADHER, SUCD4, TAL, TPI	-6,12	0,00	0,00	-2,86	0,00	0,00	-0,35	-0,06	0,00	0,00	0,00
312	ADHER, FUM, ME2, THD2	8,45	0,00	0,00	-5,39	0,00	0,00	-0,67	-0,11	6,20	0,00	0,00
313	ADHER, ATPS4r, ME2, SUCD4	6,33	0,00	2,99	-5,62	-5,00	0,00	-0,69	-0,11	0,00	0,00	0,00
314	ADHER, PPCK, PYK, SUCD4	-5,01	0,00	0,00	-3,32	0,00	0,00	-0,41	-0,07	0,00	0,00	0,00
315	ADHER, GLCpts, PPCK, SUCD4	-4,70	0,00	0,00	-3,45	0,00	0,00	-0,43	-0,07	0,00	0,00	0,00
316	ADHER, PPCK, RPE, SUCD4	-3,14	0,00	0,00	-4,01	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
317	ADHER, FUM, GLUDy, PPCK	-4,29	0,00	0,00	-3,61	0,00	0,00	-0,45	-0,07	0,00	0,00	0,00
318	ADHER, GLUDy, MDH, PPCK	-4,29	0,00	0,00	-3,61	0,00	0,00	-0,45	-0,07	0,00	0,00	0,00
319	ADHER, GLUDy, PPCK, SUCD4	-4,24	0,00	0,00	-3,63	0,00	0,00	-0,45	-0,07	0,00	0,00	0,00
320	ADHER, PPCK, SUCD4, TAL	-3,18	0,00	0,00	-4,02	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
321	ADHER, GLCpts, GLUDy, MDH	-3,68	0,00	0,00	-3,85	0,00	0,00	-0,48	-0,08	0,00	0,00	0,00
322	ADHER, GLCpts, PPCK, RPE	-2,22	0,00	0,00	-4,37	0,00	0,00	-0,54	-0,09	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación f. t. #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
323	ADHER, GLUDy, MDH, RPE	-2,19	0,00	0,00	-4,39	0,00	0,00	-0,54	-0,09	0,00	0,00	0,00
324	ADHER, GLUDy, PPCK, RPE	-2,00	0,00	0,00	-4,46	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00
325	ADHER, GLCpts, GLUDy, PPCK	-3,42	0,00	0,00	-3,96	0,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
326	ADHER, GLCpts, MDH, SUCD4	-3,35	0,00	0,00	-3,99	0,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
327	ADHER, MDH, RPE, SUCD4	-1,71	0,00	0,00	-4,57	0,00	0,00	-0,57	-0,09	0,00	0,00	0,00
328	ADHER, GLCpts, MDH, PPCK	-3,12	0,00	0,00	-4,08	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
329	ADHER, FUM, GLCpts, PPCK	-3,12	0,00	0,00	-4,08	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
330	ADHER, MDH, PPCK, RPE	-1,54	0,00	0,00	-4,64	0,00	0,00	-0,57	-0,09	0,00	0,00	0,00
331	ADHER, FUM, PPCK, RPE	-1,54	0,00	0,00	-4,64	0,00	0,00	-0,57	-0,09	0,00	0,00	0,00
332	ADHER, GLCpts, PPCK, TAL	-2,28	0,00	0,00	-4,38	0,00	0,00	-0,54	-0,09	0,00	0,00	0,00
333	ADHER, GLUDy, MDH, TAL	-2,24	0,00	0,00	-4,40	0,00	0,00	-0,54	-0,09	0,00	0,00	0,00
334	ADHER, MDH, PPCK, PYK	-3,17	0,00	0,00	-4,03	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,09	0,00	0,00
335	ADHER, FUM, PPCK, PYK	-3,17	0,00	0,00	-4,03	0,00	0,00	-0,50	-0,08	0,09	0,00	0,00
336	ADHER, GLUDy, PPCK, TAL	-2,06	0,00	0,00	-4,47	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00
337	ADHER, FUM, GLUDy, SUCD4	-2,62	0,00	0,00	-4,28	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
338	ADHER, MDH, SUCD4, TAL	-1,76	0,00	0,00	-4,59	0,00	0,00	-0,57	-0,09	0,00	0,00	0,00
339	ADHER, GLCpts, ME2, SUCD4	-2,52	0,00	0,00	-4,32	0,00	0,00	-0,53	-0,09	0,00	0,00	0,00
340	ADHER, ME2, RPE, SUCD4	-0,89	0,00	0,00	-4,90	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
341	ADHER, FUM, PPCK, TAL	-1,60	0,00	0,00	-4,65	0,00	0,00	-0,58	-0,09	0,00	0,00	0,00
342	ADHER, MDH, PPCK, TAL	-1,60	0,00	0,00	-4,65	0,00	0,00	-0,58	-0,09	0,00	0,00	0,00
343	ADHER, GLUDy, PRO1z, SUCD4	-2,37	0,00	0,00	-4,38	0,00	0,00	-0,54	-0,09	0,00	0,00	0,00
344	ADHER, FUM, GLUDy, RPE	-0,74	0,00	0,00	-4,95	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
345	ADHER, GLUDy, RPE, SUCD4	-0,72	0,00	0,00	-4,96	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
346	ADHER, GLCpts, RPE, SUCD4	-0,69	0,00	0,00	-4,98	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
347	ADHER, FUM, GLUDy, ME2	-2,29	0,00	0,00	-4,41	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00
348	ADHER, GLUDy, ME2, SUCD4	-2,28	0,00	0,00	-4,41	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00
349	ADHER, FUM, GLCpts, GLUDy	-2,16	0,00	0,00	-4,46	0,00	0,00	-0,55	-0,09	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
350	ADHer, GLCpts, GLUDy, SUCD4	-2,08	0,00	0,00	-4,49	0,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
351	ADHer, FUM, ME2, SUCD4	-1,81	0,00	0,00	-4,60	0,00	0,00	-0,57	-0,09	0,00	0,00	0,00
352	ADHer, ME2, SUCD4, TAL	-0,95	0,00	0,00	-4,91	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
353	ADHer, FUM, GLUDy, TAL	-0,77	0,00	0,00	-4,98	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
354	ADHer, GLUDy, SUCD4, TAL	-0,75	0,00	0,00	-4,99	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
355	ADHer, GLCpts, SUCD4, TAL	-0,69	0,00	0,00	-5,01	0,00	0,00	-0,62	-0,10	0,00	0,00	0,00
356	ADHer, ME2, PGL, THD2	26,98	0,00	0,00	-8,25	-20,00	0,00	-1,02	-0,17	8,93	0,00	0,00
357	ADHer, G6PDHy, ME2, THD2	26,98	0,00	0,00	-8,25	-20,00	0,00	-1,02	-0,17	8,93	0,00	0,00
358	ADHer, FUM, RPE, SUCD4	0,34	0,00	0,00	-5,38	0,00	0,00	-0,67	-0,11	0,00	0,00	0,00
359	ADHer, HEX1, RPE, SUCD4	0,56	0,00	0,00	-5,47	0,00	0,00	-0,68	-0,11	0,00	0,00	0,00
360	ADHer, CBMK2, GLU5K, PPCK	-1,05	0,00	0,00	-4,90	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
361	ADHer, CBMK2, G5SD, PPCK	-1,05	0,00	0,00	-4,90	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
362	ADHer, ASNS2, CBMK2, PPCK	-1,05	0,00	0,00	-4,90	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
363	ADHer, CBMK2, PPCK, SO4t2	-1,03	0,00	0,00	-4,91	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
364	ADHer, GLUDy, HEX1, SUCD4	-0,91	0,00	0,00	-4,96	0,00	0,00	-0,61	-0,10	0,00	0,00	0,00
365	ADHer, FUM, SUCD4, TAL	0,32	0,00	0,00	-5,41	0,00	0,00	-0,67	-0,11	0,00	0,00	0,00
366	ADHer, HEX1, SUCD4, TAL	0,52	0,00	0,00	-5,49	0,00	0,00	-0,68	-0,11	0,00	0,00	0,00
367	ADHer, FUM, HEX1, SUCD4	-0,27	0,00	0,00	-5,21	0,00	0,00	-0,65	-0,11	0,00	0,00	0,00
368	ADHer, FUM, HEX1, RPE	2,09	0,00	0,00	-6,07	0,00	0,00	-0,75	-0,12	0,00	0,00	0,00
369	ADHer, CBMK2, FUM, SUCD4	0,18	0,00	0,00	-5,39	0,00	0,00	-0,67	-0,11	0,00	0,00	0,00
370	ADHer, HEX1, PFLi, RPE	20,40	0,00	0,00	-6,22	0,00	0,00	-0,77	-0,13	8,99	0,00	0,00
371	ADHer, FUM, HEX1, TAL	2,02	0,00	0,00	-6,08	0,00	0,00	-0,75	-0,12	0,00	0,00	0,00
372	ADHer, CBMK2, FUM, HEX1	1,81	0,00	0,00	-6,05	0,00	0,00	-0,75	-0,12	0,00	0,00	0,00
373	ADHer, HEX1, PFLi, TAL	20,46	0,00	0,00	-6,24	0,00	0,00	-0,77	-0,13	9,20	0,00	0,00
374	ADHer, GLYCL, HEX1, PFLi	20,54	0,00	0,00	-6,33	0,00	0,00	-0,77	-0,13	9,39	0,00	0,00
375	ADHer, ATPS4r, GLUDy, PGI	-1,47	0,00	0,00	-4,00	-5,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
376	ADHer, PFLi, PGDH, PGI	16,32	0,00	0,00	-3,72	0,00	0,00	-0,46	-0,08	11,84	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación f, ‡, #	metabólicas	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
377	ADHEr, PFLi, PGI, TAL		16,41	0,00	0,00	-3,75	0,00	0,00	-0,46	-0,08	11,96	0,00	0,00
378	ADHEr, ATPS4r, PFK, RPE		-0,22	0,00	0,00	-4,50	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
379	ADHEr, ATPS4r, FBA, RPE		-0,22	0,00	0,00	-4,50	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
380	ADHEr, ATPS4r, RPE, TPI		-0,22	0,00	0,00	-4,50	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
381	ADHEr, PFLi, PGI, RPE		16,49	0,00	0,00	-3,76	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,07	0,00	0,00
382	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, TPI		-1,51	0,00	0,00	-4,05	-5,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
383	ADHEr, ATPS4r, FBA, GLUDy		-1,51	0,00	0,00	-4,05	-5,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
384	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, PFK		-1,51	0,00	0,00	-4,05	-5,00	0,00	-0,50	-0,08	0,00	0,00	0,00
385	ADHEr, FBA, PFLi, PGI		16,53	0,00	0,00	-3,77	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,13	0,00	0,00
386	ADHEr, PFK, PFLi, PGI		16,53	0,00	0,00	-3,77	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,13	0,00	0,00
387	ADHEr, PFLi, PGI, TPI		16,53	0,00	0,00	-3,77	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,13	0,00	0,00
388	ADHEr, PFLi, RPE, TPI		16,55	0,00	0,00	-3,78	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,15	0,00	0,00
389	ADHEr, PFK, PFLi, RPE		16,55	0,00	0,00	-3,78	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,15	0,00	0,00
390	ADHEr, FBA, PFLi, RPE		16,55	0,00	0,00	-3,78	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,15	0,00	0,00
391	ADHEr, ATPS4r, PFK, TAL		-0,23	0,00	0,00	-4,53	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
392	ADHEr, ATPS4r, FBA, TAL		-0,23	0,00	0,00	-4,53	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
393	ADHEr, ATPS4r, TAL, TPI		-0,23	0,00	0,00	-4,53	-5,00	0,00	-0,56	-0,09	0,00	0,00	0,00
394	ADHEr, FBA, PFLi, TAL		16,58	0,00	0,00	-3,80	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,18	0,00	0,00
395	ADHEr, PFLi, TAL, TPI		16,58	0,00	0,00	-3,80	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,18	0,00	0,00
396	ADHEr, PFK, PFLi, TAL		16,58	0,00	0,00	-3,80	0,00	0,00	-0,47	-0,08	12,18	0,00	0,00
397	ADHEr, GLYCL, HEX1, THD2		3,67	0,00	0,00	-6,47	0,00	0,00	-0,79	-0,13	1,43	0,00	0,00
398	ADHEr, GLUDy, PFK, PFLi		15,92	0,00	0,00	-3,42	0,00	0,00	-0,42	-0,07	12,52	0,00	0,00
399	ADHEr, GLUDy, PFLi, TPI		15,92	0,00	0,00	-3,42	0,00	0,00	-0,42	-0,07	12,52	0,00	0,00
400	ADHEr, FBA, GLUDy, PFLi		15,92	0,00	0,00	-3,42	0,00	0,00	-0,42	-0,07	12,52	0,00	0,00
401	ADHEr, EDA, PFLi, PGI		21,92	0,00	0,00	-4,32	0,00	0,00	-0,53	-0,09	20,78	0,00	0,00
402	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, RPE		4,15	0,00	0,00	-6,22	-5,00	0,00	-0,77	-0,13	0,00	0,00	0,00
403	ADHEr, ATPS4r, GLUDy, TAL		4,14	0,00	0,00	-6,26	-5,00	0,00	-0,77	-0,13	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
404	ADHER, ATPS4r, CBMK2, RPE	5,89	0,00	0,00	-6,91	-5,00	0,00	-0,85	-0,14	0,00	0,00	0,00
405	ADHER, ATPS4r, CBMK2, GLUDy	4,00	0,00	0,00	-6,26	-5,00	0,00	-0,77	-0,13	0,00	0,00	0,00
406	ADHER, ATPS4r, CBMK2, TAL	5,90	0,00	0,00	-6,96	-5,00	0,00	-0,86	-0,14	0,00	0,00	0,00
407	ADHER, ASNS2, ATPS4r, GLU5K	5,95	0,00	0,00	-7,03	-5,00	0,00	-0,87	-0,14	0,00	0,00	0,00
408	ADHER, ASNS2, ATPS4r, G5SD	5,95	0,00	0,00	-7,03	-5,00	0,00	-0,87	-0,14	0,00	0,00	0,00
409	ADHER, ACKr, PFLi, PGI	21,51	0,00	0,00	-4,32	0,00	0,00	-0,53	-0,09	21,79	0,00	0,00
410	ADHER, ACKr, AKGD, FRD2	30,15	0,00	15,19	-8,90	-20,00	0,00	-1,10	-0,18	0,00	0,00	0,00
411	ADHER, ACKr, FRD2, SUCOAS	30,09	0,00	16,64	-8,95	-20,00	0,00	-1,11	-0,18	0,49	0,00	0,00
412	ADHER, FUM, G6PDHy, TAL	11,80	0,00	0,00	-6,44	0,00	0,27	-0,76	-0,12	11,63	0,00	0,00
413	ADHER, FUM, PGDH, TAL	11,80	0,00	0,00	-6,44	0,00	0,27	-0,76	-0,12	11,63	0,00	0,00
414	ADHER, FUM, PGL, TAL	11,80	0,00	0,00	-6,44	0,00	0,27	-0,76	-0,12	11,63	0,00	0,00
415	ADHER, FUM, ME2, TPI	5,91	0,00	0,00	-4,11	0,00	0,00	-0,51	-0,08	13,43	0,00	0,00
416	ADHER, FUM, ME2, PFK	5,91	0,00	0,00	-4,11	0,00	0,00	-0,51	-0,08	13,43	0,00	0,00
417	ADHER, FBA, FUM, ME2	5,91	0,00	0,00	-4,11	0,00	0,00	-0,51	-0,08	13,43	0,00	0,00
418	ADHER, FRD2, GLUDy, LDH_D	36,99	0,00	0,00	-2,07	0,00	0,00	-0,26	-0,04	0,00	0,00	0,00
419	ADHER, FRD2, LDH_D, THD2	37,30	0,29	0,00	-19,20	0,00	0,00	-0,43	-0,07	0,00	0,00	15,46
420	ADHER, G6PDHy, HEX1, TAL	12,92	0,00	0,00	-6,60	0,00	0,27	-0,78	-0,13	12,69	0,00	0,00
421	ADHER, HEX1, PGDH, TAL	12,92	0,00	0,00	-6,60	0,00	0,27	-0,78	-0,13	12,69	0,00	0,00
422	ADHER, HEX1, PGL, TAL	12,92	0,00	0,00	-6,60	0,00	0,27	-0,78	-0,13	12,69	0,00	0,00
423	ADHER, MDH, PGDH, TAL	11,43	0,00	0,00	-5,84	0,00	0,24	-0,69	-0,11	13,54	0,00	0,00
424	ADHER, G6PDHy, MDH, TAL	11,43	0,00	0,00	-5,84	0,00	0,24	-0,69	-0,11	13,54	0,00	0,00
425	ADHER, MDH, PGL, TAL	11,43	0,00	0,00	-5,84	0,00	0,24	-0,69	-0,11	13,54	0,00	0,00
426	ADHER, PGDH, TAL, TPI	8,73	0,00	0,00	-4,23	0,00	0,18	-0,50	-0,08	15,97	0,00	0,00
427	ADHER, FBA, PGDH, TAL	8,73	0,00	0,00	-4,23	0,00	0,18	-0,50	-0,08	15,97	0,00	0,00
428	ADHER, PFK, PGDH, TAL	8,73	0,00	0,00	-4,23	0,00	0,18	-0,50	-0,08	15,97	0,00	0,00
429	ADHER, GLYCL, TAL, TPI	8,24	0,00	0,00	-4,26	0,00	0,00	-0,52	-0,09	16,38	0,00	0,00
430	ADHER, TAL, THD5, TPI	8,24	0,00	0,00	-4,21	0,00	0,00	-0,52	-0,09	16,41	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
431	ADHEr, LDH_D, TAL, TPI	8,24	0,00	0,00	-4,21	0,00	0,00	-0,52	-0,09	16,41	0,00	0,00
432	ADHEr, ASPT, EDA, MDH, PGI	-3,46	0,00	0,00	-0,39	0,00	0,00	-0,05	-0,01	0,00	0,00	0,00
433	ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, ME2	15,46	2,12	0,00	-5,10	-2,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	0,99
434	ADHEr, EDA, PFLi, PGI, PPCK	10,28	0,00	0,00	-1,38	0,00	0,00	-0,17	-0,03	0,00	0,00	0,00
435	ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, MDH	15,60	2,10	0,00	-5,18	-2,00	0,00	-0,25	-0,04	0,00	0,00	1,08
436	ADHEr, EDA, PFLi, PGI, SUCD4	10,88	0,00	0,00	-1,68	0,00	0,00	-0,21	-0,03	0,00	0,00	0,00
437	ADHEr, EDA, NADH6, PFLi, PGI	10,88	0,00	0,00	-1,68	0,00	0,00	-0,21	-0,03	0,00	0,00	0,00
438	ADHEr, EDA, NADH6, PGI, PPCK	7,19	0,00	0,00	-0,80	0,00	0,00	-0,10	-0,02	0,00	0,00	0,00
439	ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi	13,74	0,00	0,00	-3,10	0,00	0,00	-0,38	-0,06	0,00	0,00	0,00
440	ADHEr, GLUDy, HEX1, PFLi, PGI	12,79	0,00	0,00	-2,67	0,00	0,00	-0,33	-0,05	0,00	0,00	0,00
441	ADHEr, ACKr, GLCpts, NADH6, PGI	13,18	0,00	0,00	-2,35	-2,00	0,00	-0,29	-0,05	0,20	0,00	0,00
442	ADHEr, GLUDy, HEX1, NADH6, PGI	10,34	0,00	0,00	-2,15	0,00	0,00	-0,27	-0,04	0,00	0,00	0,00
443	ADHEr, EDA, GLUDy, NADH6, PGI	10,85	0,00	0,00	-2,37	0,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
444	ADHEr, ACKr, PFLi, PGI, SUCD4	10,52	0,00	2,18	-1,66	0,00	0,00	-0,21	-0,03	0,00	0,00	0,00
445	ADHEr, ACKr, NADH6, PFLi, PGI	12,71	0,00	0,00	-2,75	0,00	0,00	-0,21	-0,03	0,00	0,00	1,09
446	ADHEr, ACKr, GLUDy, NADH6, PGI	13,53	0,00	0,31	-2,61	-2,00	0,00	-0,32	-0,05	0,00	0,00	0,00
447	ADHEr, EDA, GLCpts, NADH6, PGI	13,25	0,00	0,00	-2,43	-2,00	0,00	-0,30	-0,05	0,21	0,00	0,00
448	ADHEr, ACKr, CBMK2, NADH6, PGI	14,17	0,00	0,00	-2,94	-2,00	0,00	-0,36	-0,06	0,00	0,00	0,00
449	ADHEr, ATPS4r, FDH2, NADH6, PGI	11,98	0,00	1,48	-1,92	-2,00	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
450	ADHEr, ATPS4r, NADH6, PFLi, PGI	11,98	0,00	1,48	-1,92	-2,00	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
451	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PFLi	11,92	0,00	0,00	-2,38	0,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
452	ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6, PGL	14,76	0,00	0,00	-3,75	0,00	0,00	-0,46	-0,08	0,00	0,00	0,00
453	ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, NADH6	14,76	0,00	0,00	-3,75	0,00	0,00	-0,46	-0,08	0,00	0,00	0,00
454	ADHEr, ACKr, FUM, GLUDy, LDH_D	11,37	0,00	0,00	-3,12	0,00	0,00	-0,39	-0,06	0,00	0,00	0,00
455	ADHEr, ATPS4r, NADH6, PGI, SUCD4	10,53	0,00	0,00	-2,17	-2,00	0,00	-0,27	-0,04	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
456	ADHER, ACKr, GLUDy, LDH_D, SUCD4	10,89	0,00	0,00	-3,19	0,00	0,00	-0,39	-0,06	0,00	0,00	0,00
457	ADHER, ATPS4r, G6PDHy, MDH, THD2	8,72	0,00	0,00	-3,81	0,00	0,00	-0,47	-0,08	0,00	0,00	0,00
458	ADHER, ATPS4r, MDH, PGL, THD2	8,72	0,00	0,00	-3,81	0,00	0,00	-0,47	-0,08	0,00	0,00	0,00
459	ADHER, ASPT, G6PDHy, MDH, PYK	-1,53	0,00	0,00	-2,21	0,00	0,00	-0,27	-0,04	0,00	0,00	0,00
460	ADHER, ASPT, EDA, MDH, PYK	-1,53	0,00	0,00	-2,21	0,00	0,00	-0,27	-0,04	0,00	0,00	0,00
461	ADHER, ASPT, MDH, PGL, PYK	-1,53	0,00	0,00	-2,21	0,00	0,00	-0,27	-0,04	0,00	0,00	0,00
462	ADHER, FRD2, LDH_D, MDH, SUCOAS	6,97	2,19	0,00	-4,35	0,00	0,00	-0,27	-0,04	0,12	0,00	0,00
463	ADHER, ASPT, LDH_D, MDH, SUCOAS	7,01	2,11	0,00	-4,33	0,00	0,00	-0,27	-0,04	0,35	0,00	0,00
464	ADHER, Act6, LDH_D, MDH, SUCD4	13,99	0,00	0,00	-7,14	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,00	0,00	4,89
465	ADHER, ATPS4r, GLUDy, PGI, SUCD4	8,35	0,00	0,00	-2,11	-2,00	0,00	-0,26	-0,04	0,00	0,00	0,00
466	ADHER, ASPT, FUM, LDH_D, MDH	6,45	1,98	0,00	-4,33	0,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
467	ADHER, ASPT, LDH_D, MALS, MDH	6,45	1,98	0,00	-4,33	0,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
468	ADHER, ASPT, ICL, LDH_D, MDH	6,45	1,98	0,00	-4,33	0,00	0,00	-0,29	-0,05	0,00	0,00	0,00
469	ADHER, Act6, LDH_D, MDH, NADH6	25,20	0,00	0,00	-5,48	-10,00	0,00	-0,54	-0,09	4,43	0,00	1,10
470	ADHER, FRD2, GLUDy, LDH_D, PPCK	-10,70	0,00	0,00	-1,05	0,00	0,00	-0,13	-0,02	0,00	0,00	0,00
471	ADHER, FRD2, LDH_D, PPCK, THD2	-10,60	0,00	0,00	-1,09	0,00	0,00	-0,13	-0,02	0,00	0,00	0,00
472	ADHER, ACKr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4	12,66	0,00	0,00	-4,09	-2,00	0,00	-0,51	-0,08	0,00	0,00	0,00
473	ADHER, ACKr, ACS, PPC, PPCK	-10,25	0,00	0,00	-0,96	-2,00	0,00	-0,12	-0,02	0,00	0,00	0,00
474	ADHER, GLUDy, LDH_D, PPC, PPCK	-9,20	0,00	0,00	-1,38	-2,00	0,00	-0,17	-0,03	0,00	0,00	0,00
475	ADHER, ATPS4r, FDH2, NADH6, SULabc	16,04	0,00	0,00	-4,14	-2,00	0,00	-0,51	-0,08	0,00	0,00	0,00
476	ADHER, LDH_D, PPC, PPCK, THD2	-9,09	0,00	0,00	-1,43	-2,00	0,00	-0,18	-0,03	0,00	0,00	0,00
477	ADHER, ASPT, ATPS4r, GLCpts, MDH	11,62	0,00	6,37	-2,53	0,00	0,00	-0,31	-0,05	0,00	0,00	0,00
478	ADHER, G6PDHy, MDH, NADH6, THD2	24,76	0,00	0,00	-5,93	-15,00	0,00	-0,73	-0,12	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación t, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
479	ADHEr, MDH, NADH6, PGL, THD2	24,76	0,00	0,00	-5,93	-15,00	0,00	-0,73	-0,12	0,00	0,00	0,00
480	ADHEr, ACKr, FBA, GLUDy, NADH6	23,61	0,00	0,00	-3,52	-20,00	0,00	-0,44	-0,07	0,00	0,00	0,00
481	ADHEr, ACKr, GLUDy, NADH6, PFK	23,61	0,00	0,00	-3,52	-20,00	0,00	-0,44	-0,07	0,00	0,00	0,00
482	ADHEr, ACKr, GLUDy, NADH6, TPI	23,61	0,00	0,00	-3,52	-20,00	0,00	-0,44	-0,07	0,00	0,00	0,00
483	ADHEr, ATPS4r, MTHFC, NADH6, PFLi	16,09	0,00	0,00	-4,23	-2,00	0,00	-0,52	-0,09	0,00	0,00	0,00
484	ADHEr, ATPS4r, FTHFD, NADH6, PFLi	16,09	0,00	0,00	-4,23	-2,00	0,00	-0,52	-0,09	0,00	0,00	0,00
485	ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, GLCpts, MDH	17,81	0,00	0,00	-2,93	0,00	0,00	-0,36	-0,06	10,94	0,00	0,00
486	ADHEr, ATPS4r, GLCpts, MDH, PGL	17,81	0,00	0,00	-2,93	0,00	0,00	-0,36	-0,06	10,94	0,00	0,00
487	ADHEr, ACKr, FBA, GLCpts, NADH6	24,17	0,00	0,00	-3,83	-20,00	0,00	-0,47	-0,08	0,00	0,00	0,00
488	ADHEr, ACKr, GLCpts, NADH6, TPI	24,17	0,00	0,00	-3,83	-20,00	0,00	-0,47	-0,08	0,00	0,00	0,00
489	ADHEr, ACKr, GLCpts, NADH6, PFK	24,17	0,00	0,00	-3,83	-20,00	0,00	-0,47	-0,08	0,00	0,00	0,00
490	ADHEr, ACKr, LDH_D, MDH, SUCD4	1,52	0,00	0,00	-3,46	0,00	0,00	-0,43	-0,07	0,00	0,00	0,00
491	ADHEr, ACKr, AKGD, ATPS4r, FBA	29,63	0,00	0,00	-1,94	-38,95	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
492	ADHEr, ACKr, AKGD, ATPS4r, PFK	29,63	0,00	0,00	-1,94	-38,95	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
493	ADHEr, ACKr, AKGD, ATPS4r, TPI	4,07	0,00	0,00	-1,94	-13,39	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
494	ADHEr, EDA, PGI, PPCK, SUCD4	-2,89	0,00	0,00	-0,62	0,00	0,00	-0,08	-0,01	0,00	0,00	0,00
495	ADHEr, ACKr, ATPS4r, FBA, SUCOAS	4,32	0,00	0,00	-1,95	-13,90	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
496	ADHEr, ACKr, ATPS4r, PFK, SUCOAS	4,32	0,00	0,00	-1,95	-13,90	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
497	ADHEr, ACKr, ATPS4r, SUCOAS, TPI	29,91	0,00	0,00	-1,95	-39,48	0,00	-0,24	-0,04	0,00	0,00	0,00
498	ADHEr, FRD2, LDH_D, ME2, SUCOAS	10,83	1,87	0,00	-4,10	0,00	0,00	-0,28	-0,05	0,12	0,00	0,00
499	ADHEr, ACKr, CBMK2, FBA, NADH6	24,41	0,00	0,00	-3,97	-20,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
500	ADHEr, ACKr, CBMK2, NADH6, PFK	24,41	0,00	0,00	-3,97	-20,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
501	ADHEr, ACKr, CBMK2, NADH6, TPI	24,41	0,00	0,00	-3,97	-20,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
502	ADHEr, ACKr, NADH6, RPE, TPI	24,45	0,00	0,00	-3,99	-20,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00

	Transformaciones destinadas a eliminación †, ‡, #	H2O	ILE	LAC	NH4	NO3	PHE	PI	SO4	SUC	THR	VAL
503	ADHEr, ACKr, NADH6, PFK, RPE	24,45	0,00	0,00	-3,99	-20,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
504	ADHEr, ACKr, FBA, NADH6, RPE	24,45	0,00	0,00	-3,99	-20,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00
505	ADHEr, ACKr, ASNS2, FBA, NADH6	24,46	0,00	0,00	-4,00	-20,00	0,00	-0,49	-0,08	0,00	0,00	0,00

Tabla 8. Genes correspondientes a desactivar para evitar que se produzca una reacción concreta en E. coli.

Abreviatura de la reacción	Estequiometría de la reacción*	Genes que codifican la(s) enzima(s) que catalizan cada reacción&
ACKr	[c]: ac + atp <==> actp + adp	(b3115 o b2296 o b1849)
ACS	[c]: ac + atp + coa --> accoa + amp + ppi	b4069
ACt6	ac[p] + h[p] <==> ac[c] + h[c]	No asociada a ningún gen
ADHEr	[c]: etoh + nad <==> acald + h + nadh	(b0356 o b1478 o b1241)
	[c]: acald + coa + nad <==> accoa + h + nadh	(b1241 o b0351)
AKGD	[c]: akg + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	(b0116 y b0726 y b0727)
ASNS2	[c]: asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	[c]: asp-L --> fum + nh4	b4139
ATPS4r	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <==> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735)) o ((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735) y b3739))
CBMK2	[c]: atp + co2 + nh4 <==> adp + cbp + (2) h	(b0521 o b0323 o b2874)
EDA	[c]: 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850
ENO	[c]: 2pg <==> h2o + pep	b2779
FBA	[c]: fdp <==> dhap + g3p	(b2097 o b2925 o b1773)
FBP	[c]: fdp + h2o --> f6p + pi	(b4232 o b3925)
FDH2	for[p] + (2) h[c] + q8[c] --> co2[c] + h[p] + q8h2[c]	((b3892 y b3893 y b3894) o (b1474 y b1475 y b1476))
	for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] --> co2[c] + h[p] + mql8[c]	
FRD2	[c]: fum + mql8 --> mqn8 + succ [c]: 2dmmql8 + fum --> 2dmmq8 + succ	(b4151 y b4152 y b4153 and b4154)
FTHFD	[c]: 10fthf + h2o --> for + h + thf	b1232
FUM	[c]: fum + h2o <==> mal-L	(b1612 o b4122 o b1611)
G5SD	[c]: glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	[c]: g6p + nadp <==> 6pgl + h + nadph	b1852
GLCpts	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 y b1101 y b2415 y b2416) o (b1817 y b1818 y b1819 y b2415 y b2416) o (b2417 y b1621 y b2415 y b2416))
GLU5K	[c]: atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	[c]: glu-L + h2o + nadp <==> akg + h + nadph + nh4	b1761
GLYCL	[c]: gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 y b2903 y b2905 y b0116)
HEX1	[c]: atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
ICL	[c]: icit --> glx + succ	b4015
LDH_D	[c]: lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	(b2133 o b1380)
MALS	[c]: accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014 o b2976)
MDH	[c]: mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236
ME2	[c]: mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
MTHFC	[c]: h2o + methf <==> 10fthf + h	b0529
NADH12	[c]: h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad	b1109
	[c]: h + nadh + q8 --> nad + q8h2	
	[c]: 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmql8 + nad	
NADH6	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c]	(b2276 y b2277)
	(4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c]	y b2278 y b2279
	2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmql8[c] + (3) h[p] + nad[c]	y b2280 y b2281
		y b2282 y b2283
PFK	[c]: atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916 o b1723)
PFLi	[c]: coa + pyr --> accoa + for	((b0902 y b0903) y b2579) o (b0902 y b0903) o (b0902 y b3114) o (b3951 y b3952))
PGDH	[c]: 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGI	[c]: g6p <==> f6p	b4025
PGL	[c]: 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	[c]: 2pg <==> 3pg	(b3612 o b4395 o b0755)
PPC	[c]: co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956

Abreviatura de la reacción	Estequiometría de la reacción*	Genes que codifican la(s) enzima(s) que catalizan cada reacción
PPCK	[c]: atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PRO1z	[c]: fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014
PYK	[c]: adp + h + pep --> atp + pyr	b1854 o b1676)
PYRt2	h[p] + pyr[p] <==> h[c] + pyr[c]	No asociada a ningún gen
RPE	[c]: ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301 o b3386)
SO4t2	so4[e] <==> so4[p]	(b0241 o b0929 o b1377 o b2215)
SUCD4	[c]: q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 y b0722 y b0723 y b0724)
SUCOAS	[c]: atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 y b0729)
SULabc	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 y b2425 y b2424 y b2423) o (b0763 y b0764 y b0765) o (b2422 y b2424 y b2423 y b3917))
TAL	[c]: g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464 o b0008)
THD2	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 y b1603)
THD5	[c]: nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962 o (b1602 y b1603))
TPI	[c]: dhap <==> g3p	b3919

Tabla 9. Nombres de los metabolitos correspondientes a las abreviaturas utilizadas en la Tabla 8.

Abreviatura del metabolito	Nombre del metabolito
10fthf	10-Formiltetrahidrofolato
1pyr5c	1-Pirrolina-5-carboxilato
2ddg6p	2-Deshidro-3-desoxi-D-gluconato 6-fosfato
2dmmq8	2-Demetilmenaquinona 8
2dmmql8	2-Demetilmenaquinol 8
2pg	D-Glicerato 2-fosfato
3pg	3-Fosfo-D-glicerato
6pgc	6-Fosfo-D-gluconato
6pgl	6-Fosfo-D-glucono-1,5-lactona
ca	Acetato
acald	Acetaldehído
accoa	Acetil-CoA
actp	Acetil fosfato
adp	ADP
akg	2-Oxoglutarato
amp	AMP
asn-L	L-Asparagina
asp-L	L-Aspartato
atp	ATP
cbp	Carbamoil fosfato
co2	CO2
coa	Coenzima A
dhap	Dihidroxiacetona fosfato
e4p	D-Eritrosa 4-fosfato
etoh	Etanol
f6p	D-Fructosa 6-fosfato
fad	Flavina adenina dinucleótido oxidado
fadh2	Flavina adenina dinucleótido reducido
fdp	D-Fructosa 1,6-bisfosfato
de	Formiato
fum	Fumarato
g3p	Gliceraldehído 3-fosfato
g6p	D-Glucosa 6-fosfato
glc-D	D-Glucosa
glu5p	L-Glutamato 5-fosfato
glu5sa	L-Glutamato 5-semialdehído
glu-L	L-Glutamato
glx	Glioxilato
gly	Glicina
h	H ⁺
h2o	H2O

Abreviatura del metabolito	Nombre del metabolito
icit	Isocitrato
lac-D	D-Lactato
mal-L	L-Malato
methf	5,10-Meteniltetrahidrofolato
mlthf	5,10-Metilentetrahidrofolato
mql8	Menaquinol 8
mqn8	Menaquinona 8
nad	Nicotinamida adenina dinucleótido
nadh	Nicotinamida adenina dinucleótido - reducido
nadp	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nadph	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - reducido
nh4	Amonio
oaa	Oxaloacetato
pep	Fosfoenolpiruvato
pi	Fosfato
ppi	Difosfato
pro-L	L-Prolina
pyr	Piruvato
q8	Ubiquinona-8
q8h2	Ubiquinol-8
ru5p-D	D-Ribulosa 5-fosfato
s7p	Sedoheptulosa 7-fosfato
so4	Sulfato
succ	Succinato
succoa	succinil-CoA
thf	5,6,7,8-Tetrahidrofolato
xu5p-D	D-Xilulosa 5-fosfato

Se aplicaron numerosos criterios para seleccionar los conjuntos de genes más prácticos como dianas de eliminación. En primer lugar, los diseños se limitaron a incluir solamente desactivaciones que no reducen significativamente (esto es, >5%) el rendimiento teórico máximo de BDO en condiciones anaerobias, en presencia o ausencia de nitrato como aceptor de electrones. Dichas desactivaciones crearían un techo artificial para cualquier esfuerzo futuro de ingeniería metabólica, y esto, por tanto, es indeseable. Con este fin, se resolvieron una serie de problemas de programación lineal (PL) que maximizaron el rendimiento en BDO para la red metabólica natural de E. coli suponiendo que cada reacción se eliminará individualmente de la red. Tal como se usa en el presente documento, la referencia a una red natural de E. coli supone que la ruta de BDO está disponible. El término “natural” se utiliza por tanto como un nombre sustituto de red de E. coli. Las reacciones cuya delección afectan negativamente el rendimiento máximo de BDO suponiendo que la PEP carboxiquinasa es reversible o irreversible se muestran en las Tablas 10 y 11, respectivamente. La Tabla 10 muestra reacciones que, cuando se suprimen, reducen el rendimiento teórico máximo de BDO en condiciones anaerobias en presencia o ausencia de nitrato, suponiendo que la PEP carboxiquinasa no puede utilizarse para producir oxaloacetato. La cepa AB3 contiene delecciones en ADHE, LDH_D, y PFLi. ‘Inf’ indica que los requisitos de energía no asociada con el crecimiento no se pueden satisfacer.

Tabla 10. Reacciones que, cuando se suprimen, reducen el rendimiento teórico máximo de BDO en condiciones anaerobias en presencia o ausencia de nitrato, suponiendo que la PEP carboxiquinasa no puede utilizarse para producir oxaloacetato.

Abreviatura	RENDIMIENTO MÁXICO MÍNIMO Nombre de la reacción	WT, Anaerobias 0,477 g/g		WT, Nitrato 0,528 g/g		AB3, Anaerobias 0,477 g/g	
		Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.
4HBACT	4-hidroxiubutirato acetyl-CoA transferasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
4HBDH	4-hidroxiubutirato deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
4HBTALDDH	4-hidroxiubutiraldehído deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
ACKr	acetato quinasa	0,44	93%	0,50	95%	0,44	93%
ACONT	aconitasa	0,41	86%	0,48	91%	0,41	86%
ACt6	transporte de acetato dentro/fuera mediante el mecanismo de cotransporte paralelo de protones	0,42	89%	0,53	100%	0,40	83%
ATPS4r	ATP sintasa (cuatro protones para un ATP)	0,45	95%	0,45	86%	0,45	95%
BTDP2	1,4 butanodiol deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
BTDt1	transporte de 1,4-butanodiol (difusión)	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
CO2t	transporte de CO2 hacia el exterior mediante difusión	0,36	75%	0,36	68%	0,27	57%
CS	citrato sintasa	0,41	86%	0,48	91%	0,41	86%
ENO	enolasa	0,03	7%	0,46	88%	Inf	Inf
FBA	fructosa-bisfosfato aldolasa	0,47	98%	0,53	100%	0,47	98%
FRD3	fumarato reductasa	0,47	99%	0,53	100%	0,47	99%
FUM	fumarasa	0,48	100%	0,53	100%	0,48	100%
GAPD	gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (NAD)	Inf	Inf	0,44	82%	Inf	Inf
GLCpts	transporte de D-glucosa mediante PEP: Pyr PTS	0,45	94%	0,52	99%	0,45	94%
H2Ot5	transporte de H2O mediante difusión	0,44	91%	0,47	88%	0,39	81%
ICDH _y	isocitrato deshidrogenasa (NADP)	0,48	100%	0,53	100%	0,48	100%
ICL	Isocitrato liasa	0,48	100%	0,53	100%	0,48	100%

	RENDIMIENTO MÁXICO	WT, Anaerobias		WT, Nitrato		AB3, Anaerobias	
		Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.
Abreviatura	Nombre de la reacción						
MALS	malato sintasa	0,48	100%	0,53	100%	0,48	100%
NADH6	NADH deshidrogenasa (ubiquinona-8 & 3,5 protones)	0,48	100%	0,53	100%	0,48	100%
NADH8	NADH deshidrogenasa (desmetilmenaquinona-8 & 2,8 protones)	0,47	99%	0,53	100%	0,47	99%
NO3R1	Nitrato reductasa (Ubiquinol-8)	0,48	100%	0,52	99%	0,48	100%
NO3t7	transporte de nitrato mediante el antipuerto de nitrato	0,48	100%	0,48	90%	0,48	100%
PDH	piruvato deshidrogenasa	0,43	89%	0,51	97%	0,29	60%
PFK	fosfofructoquinasa	0,47	98%	0,53	100%	0,47	98%
PGI	glucosa-6-fosfato isomerasa	0,43	90%	0,52	98%	0,43	90%
PGK	fosfoglicerato quinasa	Inf	Inf	0,44	82%	Inf	Inf
PGM	fosfoglicerato mutasa	0,03	7%	0,46	88%	Inf	Inf
PPC	fosfoenolpiruvato carboxilasa	0,40	84%	0,52	98%	0,14	30%
PTAr	fosfotransacetilasa	0,44	93%	0,50	95%	0,44	93%
SSALcoax	succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA	0,40	83%	0,52	98%	0,31	64%
TPI	triosa-fosfato isomerasa	0,35	74%	0,50	95%	0,35	74%

Tabla 10 (cont.)

Abreviatura	RENDIMIENTO MÁXIMO Nombre de la reacción	AB3, Nitrato 0,528 g/g		AB3, MDH, ASPT, Anaerobias 0,477 g/g		AB3, MDH, ASPT, Nitrato 0,528 g/g	
		Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.
4HBACT	4-hidroxibutirato acetyl-CoA transferasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
4HBDH	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
4HBTALDDH	4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
ACKr	acetato quinasa	0,50	95%	0,44	93%	0,50	95%
ACONT	aconitasa	0,48	91%	0,32	67%	0,43	81%
ACT6	transporte de acetato dentro/fuera mediante el mecanismo de cotransporte paralelo de protones	0,53	100%	0,39	83%	0,53	100%
ATPS4r	ATP sintasa (cuatro protones para un ATP)	0,45	86%	0,45	95%	0,45	86%
BTDP2	1,4 butanodiol deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
BTD1	transporte de 1,4-butanodiol (difusión)	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
CO2t	transporte de CO2 hacia el exterior mediante difusión	0,27	52%	0,26	54%	0,26	49%
CS	citrato sintasa	0,48	91%	0,32	67%	0,43	81%
ENO	enolasa	0,46	88%	Inf	Inf	0,45	85%
FBA	fructosa-bisfosfato aldolasa	0,53	100%	0,46	96%	0,52	99%
FRD3	fumarato reductasa	0,53	100%	0,47	99%	0,53	100%
FUM	fumarasa	0,53	100%	0,40	84%	0,52	99%
GAPD	gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (NAD)	0,44	82%	Inf	Inf	0,42	79%
GLCpts	transporte de D-glucosa mediante PEP: Pyr PTS	0,52	99%	0,45	94%	0,52	99%
H2Ot5	transporte de H2O mediante difusión	0,39	73%	0,36	76%	0,37	70%
ICDHy	isocitrato deshidrogenasa (NADP)	0,53	100%	0,46	96%	0,51	97%
ICL	Isocitrato liasa	0,53	100%	0,37	78%	0,52	99%

Abreviatura	RENDIMIENTO MÁXICO MÁXIMO Nombre de la reacción	AB3, Nitrato 0,528 g/g		AB3, MDH, ASPT, Anaerobias 0,477 g/g		AB3, MDH, ASPT, Nitrato 0,528 g/g	
		Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.
MALS	malato sintasa	0,53	100%	0,40	84%	0,52	99%
NADH6	NADH deshidrogenasa (ubiquinona-8 & 3,5 protones)	0,53	100%	0,48	100%	0,53	100%
NADH8	NADH deshidrogenasa (desmetilmenaquinona-8 & 2,8 protones)	0,53	100%	0,47	99%	0,53	100%
NO3R1	Nitrato reductasa (Ubiquinol-8)	0,52	99%	0,48	100%	0,52	99%
NO3t7	transporte de nitrato mediante el antipuerto de nitrato	0,48	90%	0,48	100%	0,48	90%
PDH	piruvato deshidrogenasa	0,48	91%	0,22	46%	0,47	90%
PFK	fosfofructoquinasa	0,53	100%	0,46	96%	0,52	99%
PGI	glucosa-6-fosfato isomerasa	0,52	98%	0,24	51%	0,52	98%
PGK	fosfoglicerato quinasa	0,44	82%	Inf	Inf	0,42	79%
PGM	fosfoglicerato mutasa	0,46	88%	Inf	Inf	0,45	85%
PPC	fosfoenolpiruvato carboxilasa	0,52	98%	0,00	0%	0,00	0%
PTAr	fosfotransacetilasa	0,50	95%	0,44	93%	0,50	95%
SSALcoax	succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA	0,52	98%	0,19	39%	0,52	98%
TPI	triosa-fosfato isomerasa	0,50	95%	0,28	58%	0,49	93%

ES 2 583 179 T3

La Tabla 11 muestra reacciones que, cuando se suprimen, reducen el rendimiento teórico máximo de BDO en condiciones anaerobias en presencia o ausencia de nitrato, suponiendo que la PEP carboxiquinasa puede utilizarse para producir oxaloacetato. 'Inf' indica que los requisitos de energía no asociada con el crecimiento no se pueden satisfacer.

5

Tabla 11. Reacciones que, cuando se suprimen, reducen el rendimiento teórico máximo de BDO en condiciones anaerobias en presencia o ausencia de nitrato, suponiendo que la PEP carboxiquinasa puede utilizarse para producir oxaloacetato.

Abreviatura	RENDIMIENTO MÁXIMO Nombre de la reacción	WT, Anaerobias 0,545 g/g		WT, Nitrato 0,545 g/g		AB3, Anaerobias 0,545 g/g	
		Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.
4HBACT	4-hidroxibutirato acetyl-CoA transferasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
4HBDH	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
4HBTALDDH	4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
ACKr	acetato quinasa	0,50	92%	0,53	97%	0,50	92%
ACONT	aconitasa	0,47	86%	0,51	94%	0,47	86%
BTDP2	1,4 butanodiol deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
BDT1	transporte de 1,4-butanodiol (difusión)	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
CO2t	transporte de CO2 hacia el exterior mediante difusión	0,36	67%	0,36	67%	0,33	61%
CS	citrato sintasa	0,47	86%	0,51	94%	0,47	86%
ENO	enolasa	0,07	14%	0,46	85%	Inf	Inf
GAPD	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NAD)	Inf	Inf	0,44	80%	Inf	Inf
H2Ot5	transporte de H2O mediante difusión	0,50	92%	0,50	92%	0,46	84%
ICDHγ	isocitrato deshidrogenasa (NADP)	0,50	92%	0,53	97%	0,50	92%
PDH	piruvato deshidrogenasa	0,53	97%	0,54	99%	0,39	71%
PGI	glucosa-6-fosfato isomerasa	0,54	98%	0,54	100%	0,54	98%
PGK	fosfoglicerato quinasa	Inf	Inf	0,44	80%	Inf	Inf
PGM	fosfoglicerato mutasa	0,07	14%	0,46	85%	Inf	Inf
PPCK	Fosfoenol-piruvato carboxiquinasa	0,48	88%	0,53	97%	0,48	88%
PTAr	Fosfotransacetilasa	0,50	92%	0,53	97%	0,50	92%
SSALcoax	succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA	0,52	95%	0,54	98%	0,48	89%
TPI	triosa-fosfato isomerasa	0,44	81%	0,52	96%	0,44	81%

Tabla 11 (cont.)

Abreviatura	RENDIMIENTO MÁXICO MÍNIMO Nombre de la reacción	AB3, Nitrato 0,545 g/g		AB3, MDH, ASPT, Anaerobias 0,545 g/g		AB3, MDH, ASPT, Nitrato 0,545 g/g	
		Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.	Rendimiento BDO	% de Rend. Max.
4HBACT	4-hidroxibutirato acetyl-CoA transferasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
4HBDH	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
4HBTALDDH	4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
ACKr	acetato quinasa	0,53	97%	0,48	89%	0,53	96%
ACONT	aconitasa	0,51	94%	0,36	66%	0,45	83%
BTDP2	1,4 butanodiol deshidrogenasa	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
BTDT1	transporte de 1,4-butanodiol (difusión)	0,00	0%	0,00	0%	0,00	0%
CO2t	transporte de CO2 hacia el exterior mediante difusión	0,33	61%	0,29	54%	0,30	54%
CS	citrato sintasa	0,51	94%	0,36	66%	0,45	83%
ENO	enolasa	0,46	85%	0,00	0%	0,46	85%
GAPD	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NAD)	0,44	80%	0,00	0%	0,43	80%
H2O15	transporte de H2O mediante difusión	0,46	84%	0,44	81%	0,44	81%
ICDHγ	isocitrato deshidrogenasa (NADP)	0,53	97%	0,50	92%	0,53	97%
PDH	piruvato deshidrogenasa	0,51	94%	0,31	57%	0,50	92%
PGI	glucosa-6-fosfato isomerasa	0,54	100%	0,40	73%	0,53	98%
PGK	fosfoglicerato quinasa	0,44	80%	0,00	0%	0,43	80%
PGM	fosfoglicerato mutasa	0,46	85%	0,00	0%	0,46	85%
PPCK	Fosfoenol-piruvato carboxiquinasa	0,53	97%	0,48	88%	0,53	97%
PTAr	Fosfotransacetilasa	0,53	97%	0,48	89%	0,53	96%
SSALcoax	succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA	0,54	98%	0,46	84%	0,54	98%
TPI	triosa-fosfato isomerasa	0,52	96%	0,40	73%	0,52	95%

El análisis anteriormente descrito condujo a tres observaciones críticas. Una observación fundamental fue que la acetato quinasa y la fosfotransacetilasa son necesarias para conseguir el máximo rendimiento de BDO en todas las condiciones mediante la regeneración de la acetil-CoA a partir del acetato producido por la 4-hidroxibutirato:acetil-CoA transferasa. Este hallazgo sugiere que la eliminación de la formación de acetato debido a la delección de ackA-pta puede que no sea una opción viable. Así, es probable que una cepa de éxito haya tenido que proporcionar un entorno intracelular donde la conversión de acetato en acetil-CoA sea beneficiosa y termodinámicamente factible. Por otra parte, debería encontrarse un conjunto de enzimas capaces de realizar las reducciones de BDO necesarias sin pasar por un derivado de CoA o bien, deberá aceptarse una producción simultánea de 1 mol of acetato por mol de BDO.

Una segunda observación fundamental fue que los enzimas del ciclo TCA citrato sintasa (CS), aconitasa (ACONT), e isocitrato deshidrogenasa (ICDH_y) son necesarias para conseguir el máximo rendimiento de BDO en todas las condiciones. Esto indica que el flujo del ciclo TCA inverso desde oxaloacetato a succinato a succinil-CoA debe completarse en alguna medida mediante CS, ACONT, e ICDH_y para una producción máxima.

Una tercera observación fundamental fue que sustituir la PEP carboxilasa por PEP carboxiquinasa en *E. coli* puede afectar positivamente el programa de BDO. El rendimiento máximo de BDO en condiciones anaerobias en presencia y ausencia de nitrato es del 3% y 12% inferior, respectivamente, si la PEP carboxilasa realiza la conversión de PEP en oxaloacetato en comparación con la conversión realizada por PEP carboxiquinasa. Adicionalmente, en condiciones anaerobias sin adición de nitrato, la PEP carboxiquinasa puede disminuir el requisito de actividad de la piruvato deshidrogenasa para una producción de BDO máxima. Específicamente, el rendimiento máximo de BDO disminuye un 11% si esta enzima típicamente aerobia no tiene actividad si se considera la PEP carboxiquinasa como irreversible en comparación con una reducción del 3% si la PEP carboxiquinasa puede catalizar la producción de oxaloacetato. Una alternativa a la actividad piruvato deshidrogenasa se puede utilizar mediante el acoplamiento no natural de formiato deshidrogenasa, que puede catalizar la reducción del formiato a dióxido de carbono, a la actividad de piruvato formiato liasa.

Los dos criterios siguientes aplicados para evaluar los diseños OptKnock fueron el número de desactivaciones necesarias y el rendimiento de BDO previsto a crecimiento máximo. El análisis de las estrategias de selección uno, dos y tres de la Tabla 6 (esto es, PEP carboxiquinasa supuesta como irreversible) reveló que tan pocas desactivaciones eran insuficientes para evitar elevados rendimientos de acetato. Las proporciones de acetato/BDO previstas para los diseños de delección uno, dos o tres, fue al menos 1.5. Incluso permitiendo cuatro delecciones, se consiguen solamente dos diseños, nº 99 y nº 100, con rendimientos de BDO previstos superiores a 0,35 g/g, y estos diseños sugieren la supresión del gen de la glicolisis, *pgi*, que codifica la fosfoglucoisomerasa. Dada la importancia prevista de la glicolisis en la fermentación de *E. coli*, se decidió continuar con estos diseños de alto riesgo solamente como último recurso. Adicionalmente, las delecciones sugeridas disminuyeron el rendimiento teórico máximo de los diseños nº 99 y nº 100 en un 8% y un 15%, respectivamente. La estrategia de cuatro delecciones de alto rendimiento que no afectó negativamente el rendimiento teórico máximo fue el diseño nº 129, que tenía un rendimiento de BDO previsto a crecimiento máximo de solamente 0,26 g/g.

Solamente un diseño de cinco delecciones de la Tabla 6 satisface todos los criterios para un diseño de éxito. Esta estrategia de desactivación implica la eliminación de ADH_{er} (alcohol deshidrogenasa), PFL_i (piruvato formiato liasa), LDH_D (lactato deshidrogenasa), MDH (malato deshidrogenasa), y ASPT (aspartato transaminasa). Las desactivaciones sugeridas no reducen el rendimiento teórico máximo de BDO bajo ninguna de las condiciones examinadas. Se predice que una cepa diseñada con estas desactivaciones conseguiría un rendimiento de BDO para el crecimiento máximo de 0,37 g/g suponiendo condiciones anaerobias e irreversibilidad de PEP carboxiquinasa. Este diseño tiene varias propiedades deseables. De forma más notable, evita que la red produzca altos rendimientos de los productos de fermentación natural, etanol, formiato, lactato, y succinato. La prevención de la producción de homosuccinato mediante la delección de MDH, en oposición a la eliminación de la PEP carboxilasa, fumarasa, o fumarato reductasa, es especialmente intrigante porque bloquea la ruta de fermentación productora de energía de oxaloacetato a succinato que podría aparecer si se supone que PEP carboxiquinasa es reversible sin afectar negativamente el rendimiento máximo de BDO. En este diseño, el succinato semialdehído se puede fabricar mediante succinil-CoA o alfa-cetoglutarato. El succinil-CoA se forma a partir del succinato mediante la succinil-CoA sintetasa. El succinato se puede formar a partir tanto de las reacciones del ciclo TCA inverso (PEP carboxilasa, PEP carboxiquinasa, fumarasa, fumarato reductasa) y la derivación del glioxilato (malato sintasa, isocitrato liasa).

Los límites de la solución de BDO comparado con la biomasa para las estrategias de desactivación de ADH_{er}, PFL_i, LDH_D, MDH, ASPT se muestran en las Figs. 7A y 7B, suponiendo la irreversibilidad o reversibilidad de la PEP carboxiquinasa, respectivamente. Se debe tener en cuenta que los límites de la solución se obtienen usando un modelo a escala genómica del metabolismo de *E. coli* en oposición al modelo reducido, porque dichos cálculos requieren muchos recursos de CPU. Los límites de la solución revelan que el acoplamiento del BDO con el crecimiento es sólido con respecto a la asunción de la reversibilidad de la PEP carboxiquinasa. Sin embargo, la delección de la bomba de protones transhidrogenasa (THD2) o glutamato deshidrogenasa (GLUD_y) puede ser necesaria para conseguir un acoplamiento obligatorio del crecimiento celular con la producción de BDO. El único aspecto negativo del diseño es que las delecciones de MDH y ASPT disminuyen el rendimiento máximo de ATP en la producción de BDO ligeramente (~20%) si se supone la reversibilidad de la PEP carboxiquinasa. Esto hace que la solución de crecimiento óptimo de la estrategia de diseño esté por debajo de la línea negra de BDO vs. biomasa de la red natural de la figura 7B. Sin embargo, este hallazgo sugiere la posibilidad de genomanipular un equilibrio óptimo de la actividad de MDH cuando hay suficiente cantidad presente para garantizar una producción eficaz de BDO, pero al mismo tiempo lo suficientemente limitada para evitar que el succinato se convierta en el producto

principal de la fermentación. A destacar que se prevé que el succinato sea el producto de fermentación principal de la red natural y se supone la reversibilidad de la PEP carboxiquinasa.

Las Tablas 10 y 11 listan reacciones cuya delección afecta negativamente el rendimiento máximo de BDO en una cepa intermedia, denominada como AB3, que carece de ADHER, LDH_D, y PFLi, así como una cepa que carece de ASPT y MDH además de las delecciones de AB3. A destacar que las delecciones sugeridas otorgan gran importancia a la obtención de piruvato deshidrogenasa, citrato sintasa, y actividad de aconitasa en condiciones completamente anaerobias. Si se puede conseguir suficiente actividad piruvato deshidrogenasa, una alternativa es dejar PFLi intacto y complementar su actividad con una formiato deshidrogenasa no natural que captura un equivalente reductor mientras convierte el formiato en dióxido de carbono.

La Figura 8 y la Tabla 12 representan gráficamente los intervalos de flujo que la red de E. coli puede conseguir cuando alcanza bien el rendimiento máximo de BDO (casos 1-4) o el rendimiento máximo de biomasa (caso 5) en condiciones anaerobias. Los casos 1 y 2 suponen que no se han producido delecciones de genes. El caso 2 muestra intervalos de flujo más restringidos que el caso 1 porque se ha impuesto una restricción adicional que refuerza el rendimiento máximo de BDO. Los casos 3 y 4 son análogos a los casos 1 y 2, salvo que los flujos codifican las reacciones de ADHER, ASPT, LDH_D, MDH, y PFLi se han ajustado a cero. En el caso 5 se muestran los intervalos de flujo, suponiendo una maximización del rendimiento de biomasa en presencia de desactivaciones de ADHE, ASPT, LDH_D, MDH, y PFLi.

La Tabla 12 muestra los intervalos de flujos metabólicos centrales que se pueden conseguir en condiciones anaerobias suponiendo que la PEP carboxiquinasa es reversible. Los valores de flujo en negrita se configuran como restricciones del sistema. Se consideran cinco casos: Caso 1, rendimiento máximo de BDO de la red natural; Caso 2, rendimiento máximo de ATP suponiendo rendimiento máximo de BDO de la red natural; Caso 3, rendimiento máximo de BDO de la red con flujos a través de ADHER, ASPT, LDH_D, MDH, y PFLi ajustados a cero; Caso 4, rendimiento máximo de ATP suponiendo el rendimiento máximo de BDO de la red con flujos a través de ADHER, ASPT, LDH_D, MDH, y PFLi ajustados a cero; y Caso 5, rendimiento máximo de biomasa de la red con flujos a través de ADHER, ASPT, LDH_D, MDH, y PFLi ajustados a cero.

Tabla 12. Intervalos de flujos metabólicos centrales que se pueden conseguir en condiciones anaerobias suponiendo que la PEP carboxiquinasa es reversible. Las reacciones que se suponen inactivas en los casos 3, 4, y 5 se indican en negrita.

Abreviatura de la reacción	CASO 1		CASO 2		CASO 3		CASO 4		CASO 5	
	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX
	mmol/gDW/h									
GLCpts	0,0	20,0	18,2	18,2	0,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
HEX1	0,0	20,0	1,8	1,8	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G6PDHy	0,0	27,3	0,0	0,0	0,0	15,3	0,0	0,0	0,0	0,0
PGL	0,0	27,3	0,0	0,0	0,0	15,3	0,0	0,0	0,0	0,0
PGDH	0,0	27,3	0,0	0,0	0,0	15,3	0,0	0,0	0,0	0,0
RPE	-6,4	18,2	0,0	0,0	-6,2	10,2	0,0	0,0	-0,2	-0,2
RPI	-9,1	0,0	0,0	0,0	-6,2	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,2
TKT1	-3,2	9,1	0,0	0,0	-3,1	5,1	0,0	0,0	-0,1	-0,1
TKT2	-3,2	9,1	0,0	0,0	-3,1	5,1	0,0	0,0	-0,2	-0,2
TAL	-3,2	9,1	0,0	0,0	-3,1	5,1	0,0	0,0	-0,1	-0,1
EDA	0,0	12,7	0,0	0,0	0,0	10,5	0,0	0,0	0,0	0,0
PGDHY	0,0	12,7	0,0	0,0	0,0	10,5	0,0	0,0	0,0	0,0
PGI	-7,3	20,0	20,0	20,0	4,7	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
FBP	0,0	15,9	0,0	0,0	0,0	12,7	0,0	0,0	0,0	0,0
PFK	7,3	35,9	20,0	20,0	9,5	32,7	20,0	20,0	19,7	19,7
FBA	7,3	20,0	20,0	20,0	9,5	20,0	20,0	20,0	19,7	19,7
TPI	7,3	20,0	20,0	20,0	9,5	20,0	20,0	20,0	19,7	19,7
GAPD	27,3	40,0	40,0	40,0	29,5	40,0	40,0	40,0	39,3	39,3
PGK	27,3	40,0	40,0	40,0	29,5	40,0	40,0	40,0	39,3	39,3
PGM	27,3	43,6	40,0	40,0	29,5	43,6	40,0	40,0	39,0	39,0
ENO	27,3	43,6	40,0	40,0	29,5	43,6	40,0	40,0	39,0	39,0
PYK	0,0	29,5	0,0	0,0	0,0	29,5	1,8	1,8	10,7	10,7
PDH	0,0	34,5	14,5	18,2	12,0	34,5	21,8	21,8	30,1	30,1
PFLi	0,0	11,9	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PPC	0,0	15,9	0,0	0,0	0,0	12,7	0,0	0,0	0,0	0,0
PPCK	5,5	51,4	21,8	21,8	5,5	30,9	18,2	18,2	8,1	8,1
CS	9,1	34,1	18,2	18,2	13,1	32,7	18,2	18,2	7,5	7,5
CITL	0,0	15,9	0,0	0,0	0,0	12,7	0,0	0,0	0,0	0,0
ACONT	9,1	21,8	18,2	18,2	13,1	21,8	18,2	18,2	7,5	7,5
ICDH _y	1,8	21,4	18,2	18,2	1,8	21,3	14,5	14,5	0,2	0,2
AKGD	0,0	21,4	0,0	18,2	0,0	21,3	0,0	14,5	0,0	0,0

Abreviatura de la reacción	CASO 1		CASO 2		CASO 3		CASO 4		CASO 5	
	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX
	mmol/gDW/h									
SUCOAS	0,5	20,0	3,6	3,6	0,6	20,0	7,3	7,3	14,9	14,9
FRD	0,0	12,7	3,6	3,6	0,0	8,7	3,6	3,6	7,5	7,5
FUM	-55,5	12,7	-14,5	3,6	-5,1	8,7	3,6	3,6	7,2	7,2
MDH	-50,9	33,2	-14,5	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ICL	0,0	18,2	0,0	0,0	0,0	18,2	3,6	3,6	7,2	7,2
MALS	0,0	16,4	0,0	0,0	0,0	16,4	3,6	3,6	7,2	7,2
ME	0,0	29,5	0,0	0,0	0,0	12,7	0,0	0,0	0,0	0,0
ASPTA	0,0	66,7	0,0	18,2	0,0	7,5	0,0	0,0	0,6	0,6
ASPT	0,0	66,7	0,0	18,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
LDH_D	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ADHEr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PTAr	5,9	37,7	21,8	21,8	9,1	34,5	21,8	21,8	0,1	0,1
ACKr	5,9	37,7	21,8	21,8	9,1	34,5	21,8	21,8	0,1	0,1
GLUDc	0,0	21,4	0,0	18,2	0,0	21,3	0,0	14,5	0,0	0,0
ABTA	0,0	21,4	0,0	18,2	0,0	21,2	0,0	14,5	0,0	0,0
SSAL_coa	0,5	37,7	3,6	21,8	0,6	34,5	7,3	21,8	14,8	14,8
ATPM	0,0	15,9	15,9	15,9	0,0	12,7	12,7	12,7	7,6	7,6
BDOsyn	21,8	21,8	21,8	21,8	21,8	21,8	21,8	21,8	14,8	14,8
	1/h									
BIOMASA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,21	0,21

Los dos primeros diseños de cuatro delecciones (nº 92 y nº 93) relacionados en la Tabla 7 (esto es, PEP carboxiquinasa supuesta reversible) se consideran más adelante debido a sus rendimientos de BDO previstos relativamente elevados. El diseño nº 92 (ADHEr, HEX1, PFLi, y PGI) necesitaría desactivaciones adicionales que eliminaran la producción de succinato y lactato y el rendimiento máximo de BDO del diseño nº 93 (ADHEr, EDA, NADH6, PGI) solamente fue el 90% del máximo teórico de la red natural. Ambos diseños requieren la eliminación de PGI que, como se ha mencionado anteriormente, se descartó por indeseable debido a la importancia prevista de la glucólisis sobre la fermentación. El diseño nº 98 (ADHEr, ATPS4r, FDH2, NADH6) fue el primer diseño de cuatro delecciones que requiere la eliminación de la ATP sintasa sin requerir adicionalmente la desactivación de PGI. Sin embargo, este diseño también requeriría la delección de genes para evitar la producción de lactato y succinato para aumentar el rendimiento de BDO previsto a crecimiento máximo. Tras análisis posterior, se descubrió que casi todos los diseños prometedores de la Tabla 7 se podían mejorar garantizando que las delecciones (es decir, ADHEr, LDH_D, MDH, ASPT, y PFLi) también se habían implementado, si no se había especificado ya.

Los siguientes esfuerzos se centraron a continuación en identificar las delecciones de reacciones que pudieran suministrar el conjunto fundamental (esto es, ADHEr, LDH_D, MDH, ASPT, PFLi). La Tabla 13 muestra genes de E. coli conocidos responsables de catalizar las reacciones diana para su eliminación. La designación “[c]” se refiere a citosólico. Los genes que codifican estas reacciones, junto las reacciones del conjunto fundamental, se proporcionan en la Tabla 13. El efecto de las delecciones adicionales sobre los límites de la solución de BDO versus biomasa se muestra en la figura 9. De forma notable, el acoplamiento entre el BDO y la producción de biomasa se vuelve cada vez más pronunciado a medida que se acumulan delecciones adicionales. El rendimiento de BDO previsto a crecimiento máximo tras acumular todas las delecciones es de 0,46 g/g. Finalmente, ninguna de las delecciones afectó negativamente el rendimiento teórico máximo de BDO.

Tabla 13. Genes de E. coli conocidos responsables de catalizar las reacciones diana para su eliminación.

Abreviatura de la reacción	Estequiometría de la reacción	Genes que codifican la(s) enzima(s) que catalizan cada reacción
ADHEr	[c]: etoh + nad <=> acald + h + nadh [c]: acald + coa + nad <=> accoa + h + nadh	(b0356 o b1478 o b1241) (b1241 o b0351)
PFLi	[c]: coa + pyr --> accoa + for	((b0902 y b0903) y b2579) o (b0902 y b0903) o (b0902 y b3114) o (b3951 y b3952))
MDH	[c]: mal-L + nad <=> h + nadh + oaa	b3236
ASPT	[c]: asp-L --> fum + nh4	b4139
LDH_D	[c]: lac-D + nad <=> h + nadh + pyr	(b2133 o b1380)
DHAPT	[c]: dha + pep --> dhap + pyr	(b1200 y b1199 y b1198 y b2415 y b2416)
DRPA	[c]: 2dr5p --> acald + g3p	b4381
PYK	[c]: adp + h + pep --> atp + pyr	(b1854 o b1676)
EDD	[c]: 6pgc --> 2ddg6p + h2o	b1851
GLYCLTDx	[c]: glx + h + nadh --> glyclt + nad	(b3553 o b1033)
GLYCLTDy	[c]: glx + h + nadph --> glyclt + nadp	

Abreviatura de la reacción	Estequiometría de la reacción	Genes que codifican la(s) enzima(s) que catalizan cada reacción
MCITS	[c]: h2o + oaa + pcoa --> 2mcit + coa + h	b0333
INSK	[c]: atp + ins --> adp + h + imp	b0477

En los resultados mostrados en la Tabla 13, OptKnock identifica reacciones a eliminar de un organismo para potenciar la producción bioquímica. Cualquier combinación (esto es, al menos una y como máximo todas) de las delecciones de genes relacionadas podría tener, teóricamente, el efecto deseado de garantizar que la correspondiente reacción no es funcional en *E. coli*. La estrategia experimental más práctica para eliminar las reacciones marcadas para su eliminación se debe determinar caso por caso.

EJEMPLO VI

Generación de cepas genomanipladas

Para validar las predicciones informáticas del Ejemplo V, las cepas se construyeron, se hicieron evolucionar, y se sometieron a ensayo. *Escherichia coli* K-12 MG1655 sirve como la cepa natural en la que se introducen las delecciones. Las cepas se construyeron mediante la incorporación de delecciones en marco usando recombinación homóloga usando el sistema X-Red recombinasa de (Datsenko y Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-6645 (2000)). El enfoque implica la sustitución de una secuencia cromosómica (esto es, el gen marcado para eliminación) por un gen de resistencia a antibióticos seleccionable, que posteriormente se elimina a su vez. Las desactivaciones se integran una por una en la cepa receptora. Después de cada delección no permanece ningún marcador de resistencia a fármacos ni cicatrices, lo que permite la acumulación de múltiples mutaciones en cada cepa diana. La tecnología de delección elimina completamente el gen marcado para eliminación de tal forma que se reduce sustancialmente la posibilidad de que los mutantes contruidos reviertan al tipo natural. Durante las etapas iniciales del desarrollo de la cepa, los genes no nativos que permiten la producción de BDO se expresan en un operón sintético tras un promotor inducible en un plásmido con un número de copias medio o alto; por ejemplo, el promotor PBAD que se induce por arabinosa, en un plásmido de la serie pBAD (Guzman et al., *J. Bacteriol.* 177:4121-4130 (1995)). Se sabe que este promotor es muy fácil de titular, permitiendo afinar la expresión en un intervalo de 1000 veces el intervalo de concentraciones de arabinosa. Si la producción de BDO tiene éxito, estos genes posteriormente se integran en el cromosoma para promover la estabilidad.

Las cepas genomanipladas se caracterizan por la medición de la tasa de crecimiento, tasa de captación de sustrato, y tasa de secreción de productos/subproductos. Se anticipó inicialmente que estas cepas mostrarían tasas de crecimiento subóptimas hasta que sus redes metabólicas se hubieran ajustado a sus funcionalidades ausentes. Para permitir este ajuste, las cepas evolucionan de forma adaptativa. Al someter las cepas a evolución adaptativa, la tasa de crecimiento celular se convierte en la presión de selección principal y las células mutantes se ven impulsadas a recolocar sus flujos metabólicos para aumentar sus tasas de crecimiento. Se ha demostrado recientemente esta reprogramación del metabolismo para varios mutantes de *E. coli* que habían evolucionado de forma adaptativa sobre distintos sustratos para alcanzar tasas de crecimiento previstas a priori mediante un modelo in silico (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004)). Si las predicciones de OptKnock tuvieran éxito, las mejoras en el crecimiento conseguidas por la evolución adaptativa van acompañadas de las tasas de producción de BDO mejoradas. La evolución adaptativa se realiza por triplicado (realizado en paralelo) debido a las diferencias en los patrones evolutivos usados como testigos previamente en *E. coli* (Fong y Palsson, más arriba, 2004; Fong et al., *J. Bacteriol.* 185:6400-6408 (2003); Ibarra et al., *Nature* 420:186-189 (2002)) que potencialmente podrían dar como resultado una cepa con cualidades de producción superiores a las demás. Las evoluciones iw actúan durante un periodo de 2-6 semanas, dependiendo de la mejora en la tasa de crecimiento obtenida. En general, las evoluciones q43 se detienen una vez que se obtiene un fenotipo de crecimiento estable.

Tras el proceso de evolución adaptativa, las cepas nuevas se vuelven a caracterizar por la medición de la tasa de crecimiento, tasa de captación de sustrato, y tasa de secreción de productos/subproductos. Estos resultados se comparan con las predicciones de OptKnock representando gráficamente los rendimientos de crecimiento y producción reales a lo largo de la producción anteriormente descrita. Las combinaciones de diseño OptKnock/evolución de más éxito se seleccionan para investigación adicional, y se caracterizan en fermentaciones de laboratorio tanto continuas como discontinuas. El concepto de producción bioquímica acoplada al crecimiento que está detrás del enfoque OptKnock también da como resultado la generación de productores en exceso genéticamente estables. Por tanto, los cultivos se mantienen en modo continuo durante un mes para evaluar su estabilidad a largo plazo. Se toman muestras periódicamente para garantizar que el rendimiento y la productividad se mantienen durante la totalidad del proceso.

EJEMPLO VII

Cepas OptKnock para la producción del BDO

Como se describe en los Ejemplos V y VI, la aplicación de la metodología OptKnock se ha aplicado a la generación de dianas de delección prometedoras que generan cepas productoras de BDO. OptKnock identifica reacciones a eliminar de un organismo para acoplar los rendimientos de producción bioquímica y de biomasa. El diseño proporciona una lista de las reacciones metabólicas que se deben considerar para su eliminación mediante OptKnock. También se proporcionaron los genes de *E. coli* conocidos que codifican los enzimas que catalizan cada

reacción para describir qué modificaciones genéticas se deben implementar para conseguir los fenotipos de producción acoplada al crecimiento previstos. Evidentemente, si nuevos descubrimientos revelan que otros genes del genoma de *E. coli* pueden transmitir una o más de las funcionalidades de reacción consideradas para eliminación en un diseño dado, entonces, estos genes deberían eliminarse junto con los descritos en el presente documento. A destacar que evitar la actividad de solamente un subconjunto (esto es, al menos una y como máximo todas) de las reacciones en cada uno de los diseños puede ser a veces suficiente para transmitir un fenotipo de producción acoplada al crecimiento. Por ejemplo, si un diseño requiere la eliminación de una reacción particular cuya actividad *in vivo* no es suficiente para desacoplar el crecimiento de la producción de BDO, entonces, los genes que codifican los enzimas que catalizan esta reacción pueden dejarse intactos. Además, cualquier combinación (esto es, al menos una y como máximo todas) de las delecciones de genes relacionadas para una reacción dada podría tener, teóricamente, el efecto deseado de garantizar que la reacción no es funcional en *E. coli*.

En la Tabla 6 y 7 se relacionan múltiples estrategias de delección para potenciar el acoplamiento entre la producción de 1,4-butanodiol y el crecimiento de *E. coli* suponiendo que PEP carboxiquinasa es irreversible y reversible, respectivamente. Un diseño (esto es, ADHEr, ASPT, MDH, LDH_D, PFLi) surgió como el más prometedor que satisfacía múltiples criterios. Las delecciones sugeridas 1) condujeron a un elevado rendimiento de BDO previsto a crecimiento máximo, 2) requirió un número de desactivaciones razonable, 3) no tuvo un efecto perjudicial sobre el rendimiento teórico máximo de BDO, 4) consiguió un acoplamiento fuerte entre la producción de BDO y el crecimiento celular, y 5) era sólido con respecto a la reversibilidad o irreversibilidad de la PEP carboxiquinasa. La siguiente lista especifica el conjunto mínimo de delecciones génicas necesarias previstas para convertir BDO en el principal producto de fermentación de *E. coli*:

adhE (b1421), ldhA (b1380).

pflAB (b0902, b0903) no está incluido en el conjunto mínimo porque su delección fuerza una dependencia de la piruvato deshidrogenasa para proporcionar cantidad suficiente de acetil-CoA para el crecimiento celular y un equivalente de reducción para el piruvato. Como la actividad de la piruvato deshidrogenasa es baja en condiciones anaerobias y está inhibida por concentraciones elevadas de NADH, una alternativa plausible a la delección pflAB es añadir una formiato deshidrogenasa no natural a *E. coli* que recoja el poder reductor que se pierde por otra parte mediante la secreción del formiato. Sin embargo, la adición de pflAB al conjunto de delección mínimo proporciona:

adhE (b1421), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903).

mdh (b3236) no está incluido en el conjunto mínimo porque hay múltiples delecciones que pueden evitar que el succinato se convierta en el producto de fermentación principal de *E. coli* en oposición a BDO. Los ejemplos incluyen los genes que codifican la fumarasa y/o fumarato reductasa. Sin embargo, la eliminación de la malato deshidrogenasa parece ser la elección más lógica para atenuar la producción de succinato ya que deja intacta una ruta para la conversión del producto derivado de glioxolato, malato, en BDO. La adición de la malato deshidrogenasa al conjunto mínimo proporciona:

adhE (b1421), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), mdh (b3236).

El gen, mqo, que codifica una malato:quinona-oxidoreductasa, se cree que cataliza la oxidación de malato a oxalactato (van der Rest et al., *J. Bacteriol.* 182:6892-6899 (2000)). Sin embargo, si se demuestra que también cataliza la formación de malato a partir de oxaloacetato, su eliminación será necesaria para garantizar que no evita la delección de mdh. Esto conduce al conjunto de delección:

ES 2 583 179 T3

adhE (b1421), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), mdh (b3236), mqo (b2210).

aspA queda fuera del conjunto mínimo porque existe la duda de si la aspartato desaminasa puede transportar flujo suficiente para evitar la delección de la malato deshidrogenasa. Sin embargo, aunque este escenario es ciertamente posible, entonces la lista mínima de delecciones necesarias se convierte en:

adhE (b1421), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), mdh (b3236), aspA (b4139).

Para los cálculos anteriores, se supone que los enzimas málicas dependientes de NADH y NADPH de E. coli operan de forma irreversible, catalizando solamente la conversión del malato en dióxido de carbono y piruvato. Si estas enzimas pueden catalizar también la formación de malato a partir de piruvato y dióxido de carbono, los genes que codifican una o ambas enzimas málicas deberán eliminarse para evitar que el succinato se convierta en el producto de fermentación principal. Esto conduce al siguiente conjunto de delecciones:

adhE (b1421), mdh (b3236), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), sfcA (b1479)

adhE (b1421), mdh (b3236), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), maeB (b2463)

adhE (b1421), mdh (b3236), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), sfcA (b1479), maeB (b2463)

El conjunto mínimo de delecciones se puede complementar con delecciones adicionales destinadas a refinar el acoplamiento de la producción de BDO con el crecimiento celular. Estos conjuntos de delecciones se relacionan a continuación.

adhE (b1421), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), mdh (b3236), pntAB (b1602, b1603)

adhE (b1421), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), mdh (b3236), gdhA (b1761)

adhE (b1421), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), mdh (b3236), pykA (b1854), pykF (b1676), dhaKLM (b1198, b1199, b1200), deoC (b4381), edd (b1851), yiaE (b3553), ycdW (b1033)

adhE (b1421), ldhA (b1380), pflAB (b0902, b0903), mdh (b3236), pykA (b1854), pykF (b1676), dhaKLM (b1198, b1199, b1200), deoC (b4381), edd (b1851), yiaE (b3553), ycdW (b1033), prpC (b0333), gsk (b0477)

Las cepas que tienen las delecciones indicadas en este Ejemplo se pueden complementar con delecciones adicionales si se descubre que las delecciones sugeridas no reducen la actividad de sus correspondientes reacciones en la medida que exige alcanzar la producción de BDO acoplada al crecimiento o si los genes de E. coli naturales, mediante evolución adaptativa o mutagénesis, consiguen mutaciones que transmitan actividades capaces de evitar las estrategias de diseño propuestas.

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo no natural que comprende un conjunto de modificaciones metabólicas que comprenden

5 la perturbación de los genes *adhE*, *ldhA*, *pflAB* y *mdh*,
 en el que el microorganismo comprende además una ruta biosintética de 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al
 menos un ácido nucleico exógeno que codifica la 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,
 10 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 cantidad
 suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO).

15 2. El microorganismo no natural de la reivindicación 1, en el que dicho conjunto de modificaciones metabólicas
 comprende adicionalmente la perturbación de *aspA*.

3. El microorganismo no natural de la reivindicación 1, en el que dicho conjunto de modificaciones metabólicas
 comprende adicionalmente la perturbación de uno o más del grupo que consiste de:

20 uno o más genes seleccionados entre el conjunto de genes que consiste de *mgo*, *aspA*, *sfcA*, *maeB*, *pntAB* y
gdhA;
sfcA y *maeB*;
 uno o más genes seleccionados entre el conjunto de genes que consiste de *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*,
yiaE, *ycdW*, *prpC* y *gsk*;
 25 *pykA*, *pykF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE* y *ycdW*;
pykA, *pykIF*, *dhaKLM*, *deoC*, *edd*, *yiaE*, *ycdW*, *prpC* y *gsk*.

30 4. El microorganismo no natural de las reivindicaciones 1-3, en el que dichas perturbaciones génicas comprenden la
 delección de un gen.

5. El microorganismo no natural de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho microorganismo es una bacteria,
 levadura u hongo.

35 6. El microorganismo no natural de la reivindicación 1-5, en el que dicho microorganismo se selecciona entre *E. coli*
 y levadura.

7. El microorganismo no natural de la reivindicación 6, en el que dicho microorganismo es *E. coli*.

40 8. El microorganismo no natural de la reivindicación 5, en el que dicha bacteria o levadura es una especie
 seleccionada de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Anaerobosprillum 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*, *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces cerevisiae*,
 45 *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus*
niger y *Pichia pastoris*.

9. Un método de producir 1,4-butanodiol, que comprende:

50 (a) cultivar un microorganismo no natural de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en fase de crecimiento
 exponencial, en una cantidad suficiente de nutrientes y medios; y
 (b) aislar el 1,4-butanodiol producido a partir de dicho microorganismo no natural.

10. El método de la reivindicación 9, en el que el 1,4-butanodiol se aísla mediante destilación.

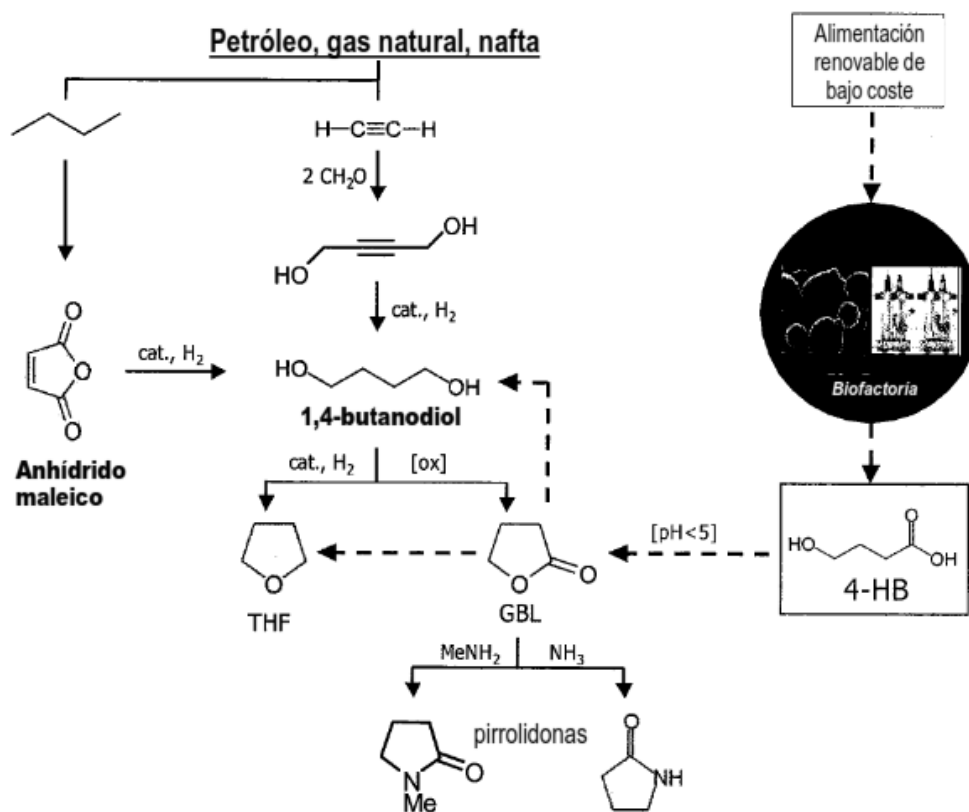


FIGURA 1

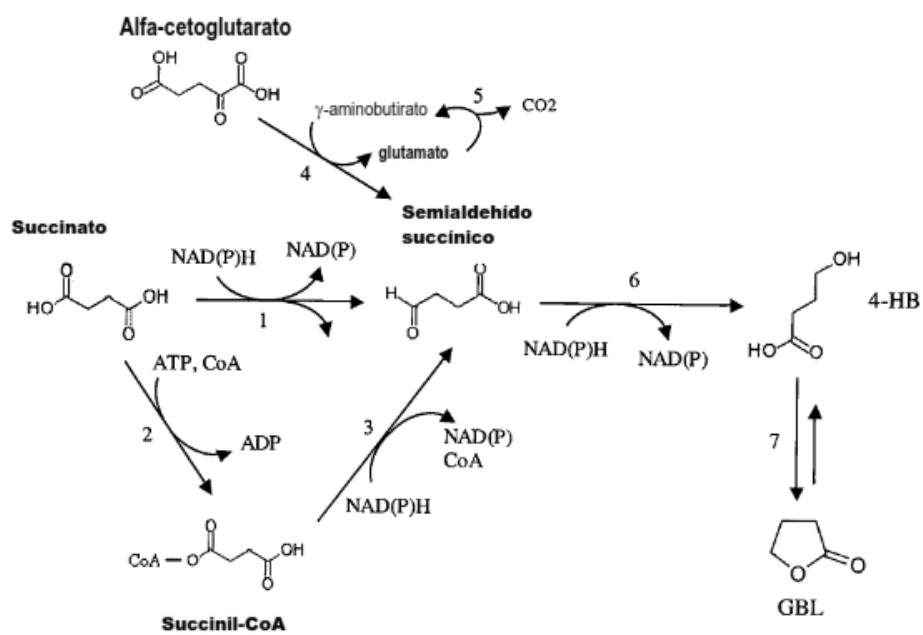


FIGURA 2

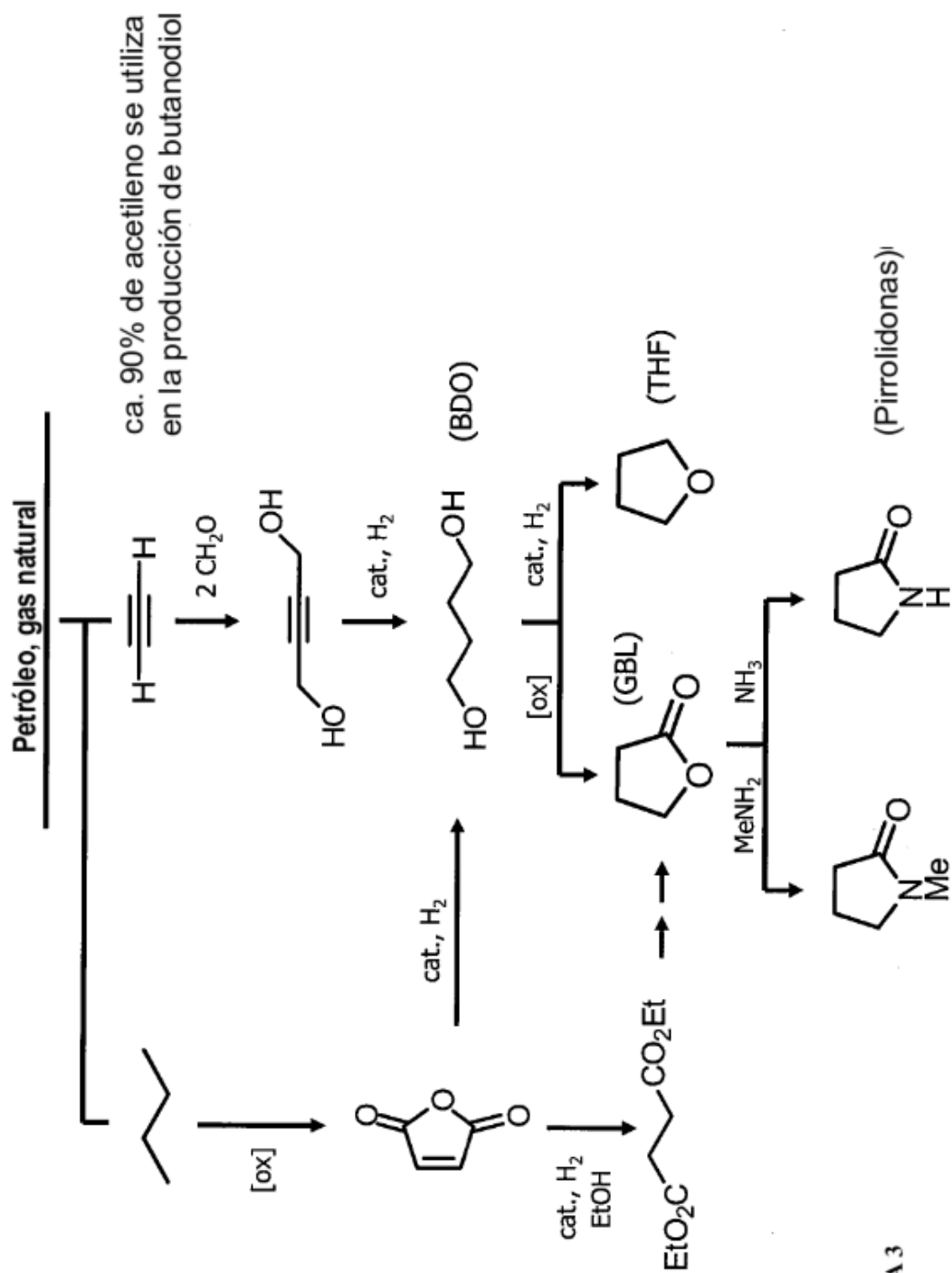


FIGURA 3

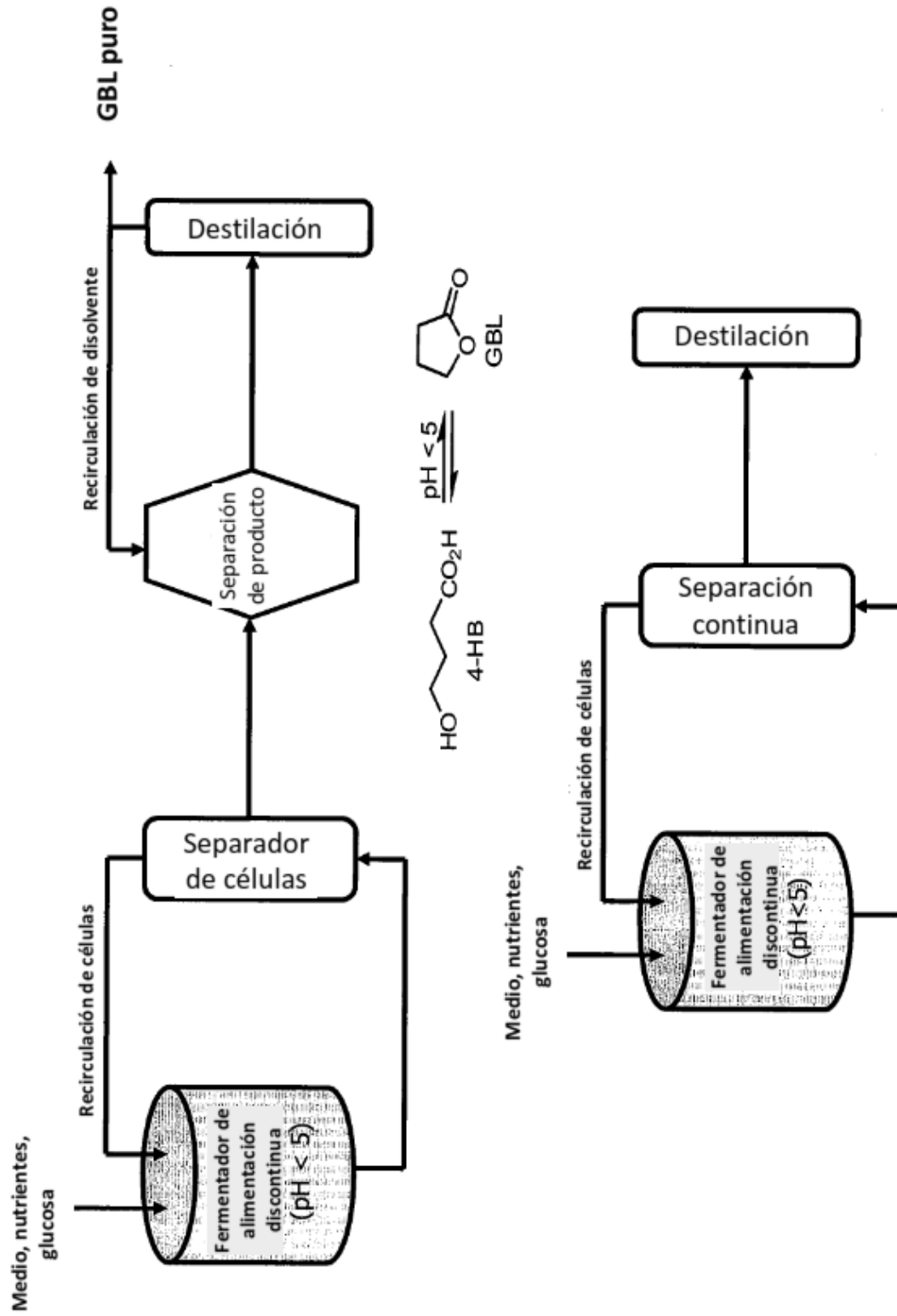
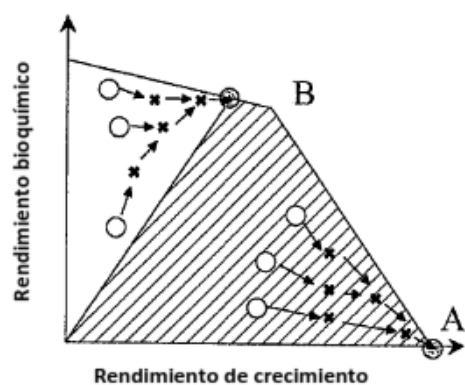


FIGURA 4



La producción bioquímica abarca:

☒ Cepa de producción típica

☐ Cepa diseñada mediante OptKnock

Fenotipos potenciales:

☐ Antes de la selección por crecimiento

☒ Después de la selección por crecimiento

FIGURA 5

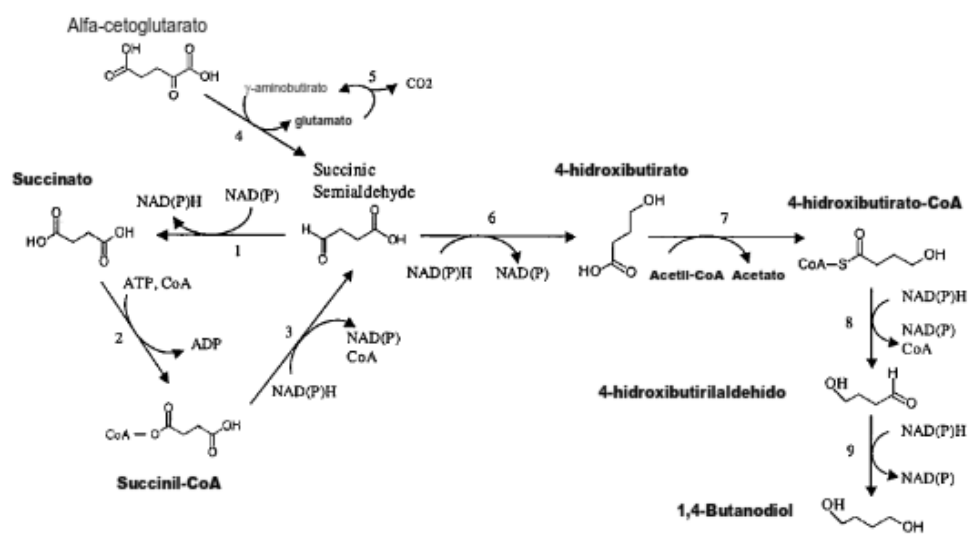


FIGURA 6

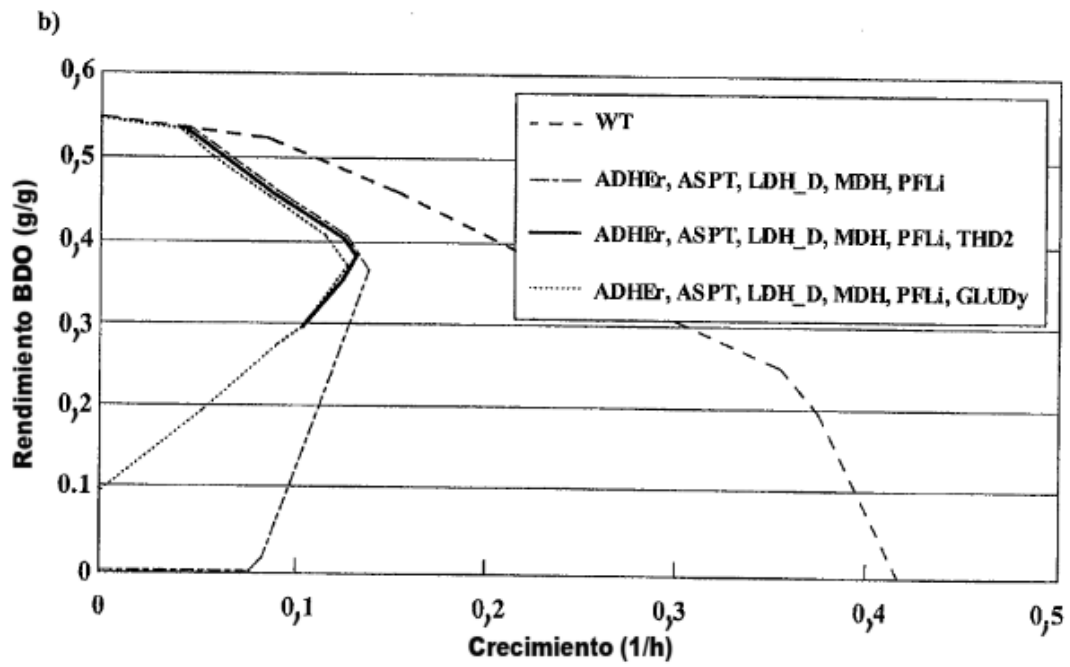
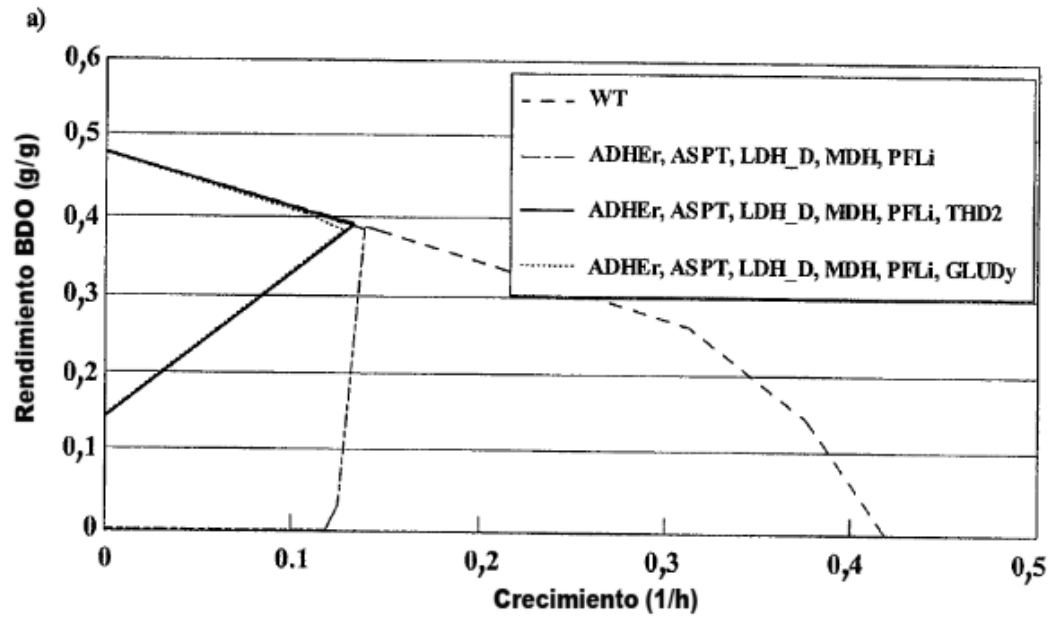


FIGURA 7

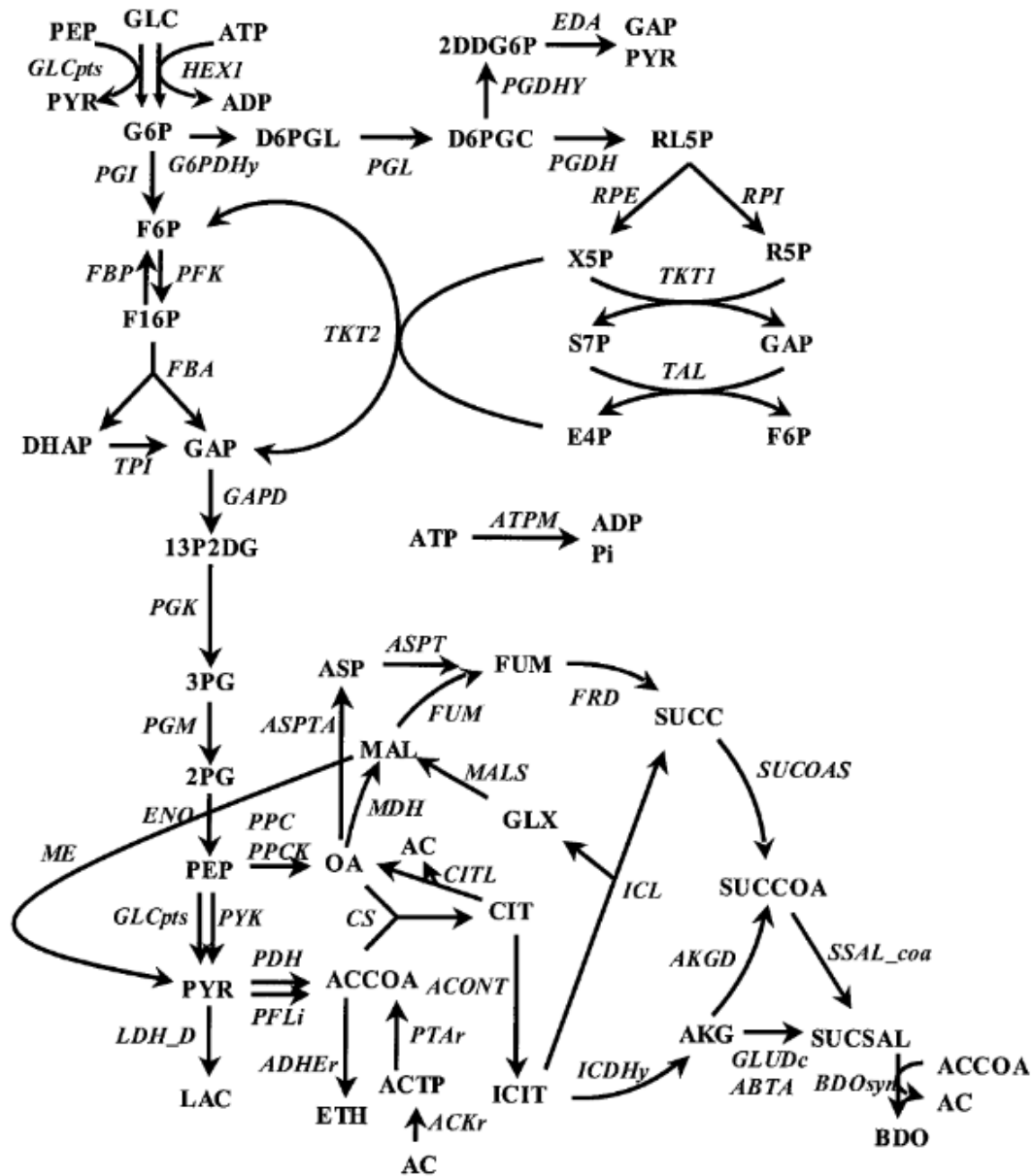


FIGURA 8

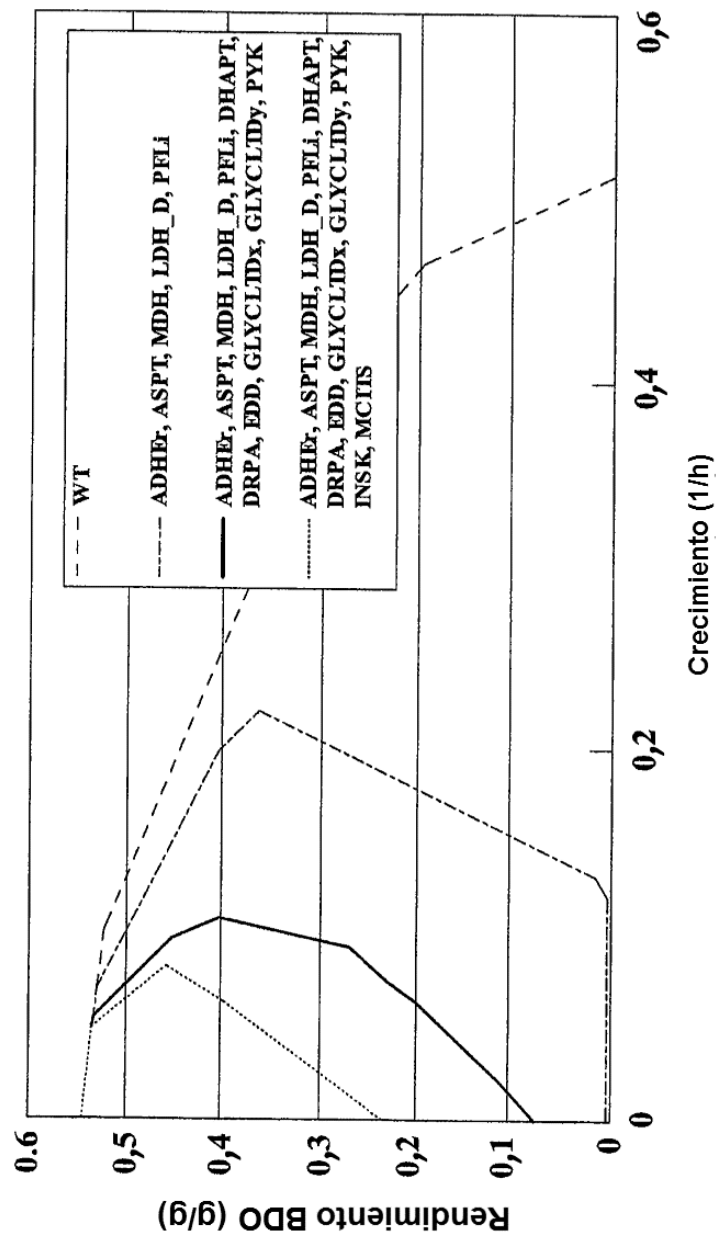


FIGURA 9