

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 117**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2010** **PCT/US2010/033300**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010** **WO10127319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010** **E 10770464 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016** **EP 2424975**

54 Título: **Organismos para la producción de 1,3-butanodiol**

30 Prioridad:

30.04.2009 US 174473 P

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

05.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BURGARD, ANTHONY, P.;
BURK, MARK, J.;
OSTERHOUT, ROBIN, E. y
PHARKYA, PRITI

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

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

ES 2 593 117 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

Organismos para la producción de 1,3-butanodiol

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere en general a organismos que se producen de manera no natural que pueden producir el producto químico básico 1,3-butanodiol. El 1,3-butanodiol (1,3-BDO) es un diol de cuatro carbonos producido de manera tradicional a partir de acetileno a través de su hidratación. El acetaldehído resultante se convierte entonces en 3-hidroxibutiraldehído que se reduce posteriormente para formar 1,3-BDO. En los últimos años, se ha reemplazado el acetileno por el etileno menos costoso como una fuente de acetaldehído. El 1,3-BDO se usa comúnmente como disolvente orgánico para agentes aromatizantes alimentarios. También se usa como comonomero para resinas de poliéster y poliuretano y se emplea ampliamente como agente hipoglucémico. El 1,3-BDO ópticamente activo es un material de partida útil para la síntesis de compuestos biológicamente activos y cristales líquidos. Un uso comercial sustancial del 1,3-butanodiol es su deshidratación posterior para dar 1,3-butadieno (Ichikawa *et al.*, J. of Molecular Catalysis A-Chemical, 256:106-112 (2006); Ichikawa *et al.*, J. of Molecular Catalysis A-Chemical, 231:181-189 (2005)), un producto petroquímico de 25 mil millones de libras/año usado para fabricar cauchos sintéticos (por ejemplo, neumáticos), látex y resinas. La dependencia de materias primas basadas en el petróleo o bien para acetileno o bien para etileno justifica el desarrollo de una ruta basada en materias primas renovables para dar 1,3-butanodiol y para dar butadieno.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar microorganismos y métodos de su uso para producir 1,3-BDO. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

Kosaka *et al.* se refieren a la caracterización del operón sol en *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ("Characterization of the sol operon in butanol-hyperproducing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4 and its degeneration mechanism.", Biosci Biotechnol Biochem. enero de 2007; 71(1):58-68. Publicación electrónica del 7 de enero de 2007).

Matsuyuma *et al.* se refieren a una cepa de *E. coli* recombinante que expresa alcohol secundario deshidrogenasa CpSADH de *Candida parapsilosis* ("Industrial production of (R)-1,3-butanediol by new biocatalysts", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, volumen 11, números 4-6, 22 de enero de 2001, páginas 513-521)

Sumario de la invención

La presente invención se define de la siguiente manera:

1. Un organismo microbiano que se produce de manera no natural que tiene una ruta de 1,3-butanodiol (1,3-BDO), en el que dicho organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído) expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-BDO.

2. El organismo microbiano que se produce de manera no natural del punto 1, en el que dicha 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *acr1*, *sucD*, *bphG*, *bld*, *adhE*, *Msed_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci_2370*, *Ald* y *eutE*.

3. El organismo microbiano que se produce de manera no natural del punto 1 ó 2, que comprende además al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una 3-hidroxibutiraldehído reductasa.

4. El organismo microbiano que se produce de manera no natural del punto 3, en el que dicha 3-hidroxibutiraldehído reductasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdh I*, *bdh II*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsb*, *dhat* y *3hidh*.

5. El organismo microbiano que se produce de manera no natural de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, que comprende además al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una acetoacetyl-CoA reductasa (reducción de cetona).

6. El organismo microbiano que se produce de manera no natural del punto 5, en el que dicha acetoacetyl-CoA reductasa (reducción de cetona) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed_1423*, *Msed_0399*, *Msed_0389*, *Msed_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* y *bdh*.

7. El organismo microbiano que se produce de manera no natural de uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que dicho organismo microbiano comprende dos, tres, cuatro, o cinco ácidos nucleicos exógenos, que codifican cada uno para una enzima de la ruta de 1,3-BDO.

8. El organismo microbiano que se produce de manera no natural de uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que

dicho organismo microbiano que se produce de manera no natural está en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

9. El organismo microbiano que se produce de manera no natural de uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que dicho al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.

10. Un método para producir 1,3-BDO, que comprende cultivar un organismo microbiano que se produce de manera no natural según uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-BDO.

11. El uso del organismo microbiano que se produce de manera no natural según uno cualquiera de los puntos 1 a 9, para producir 1,3-BDO, que comprende cultivar el organismo microbiano en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-BDO.

12. El método del punto 10 o el uso del punto 11, que comprende además separar 1,3-BDO de otros componentes en el cultivo.

13. El método o el uso del punto 12, en el que la separación comprende extracción, extracción líquido-líquido continua, pervaporación, filtración con membrana, separación con membrana, ósmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de absorción o ultrafiltración.

14. El método o el uso del punto 12 ó 13, en el que la separación comprende destilación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra rutas para 1,3-BDO a partir de alanina. Las enzimas son: A) AKP tiolasa, B) AKP aminotransferasa o AKP oxidorreductasa (desaminación), C) 2,4-dioxopentanoato descarboxilasa, D) 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído), E) AKP descarboxilasa, F) 4-aminobutan-2-ona amoniaco-liasa, G) butenona hidratasa, H) 4-hidroxi-2-butanona reductasa, I) AKP amoniaco-liasa, J) acrilato de acetilo descarboxilasa, K) 4-aminobutan-2-ona aminotransferasa o 4-aminobutan-2-ona oxidorreductasa (desaminación), L) AKP deshidrogenasa, M) 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa o 2-amino-4-hidroxipentanoato oxidorreductasa (desaminación), N) 2-oxo-4-hidroxipentanoato descarboxilasa, O) 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de cetona) y P) 3-hidroxibutiraldehído reductasa.

La figura 2 muestra rutas de acetoacetil-CoA a 1,3-butanodiol. Las enzimas son: A) acetoacetil-CoA reductasa (formación de aldehído, dependiente de CoA), B) 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de cetona), C) 3-hidroxibutiraldehído reductasa, D) acetoacetil-CoA reductasa (formación de alcohol, dependiente de CoA), E) 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído), F) 4-hidroxi-2-butanona reductasa, G) acetoacetil-CoA reductasa (reducción de cetona), H) 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído) e I) 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol).

La figura 3 muestra rutas de 4-hidroxibutiril-CoA a 1,3-butanodiol. Las enzimas son: A) 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, B) crotonasa, C) 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído), D) 3-hidroxibutiraldehído reductasa y E) 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol).

La figura 4 muestra aldehído deshidrogenasas que muestran actividad significativa sobre 3-hidroxibutiril-CoA.

La figura 5 muestra la actividad específica de *bld* de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sobre 3-hidroxibutiril-CoA antes y después de la diálisis.

La figura 6 muestra concentraciones de 1,3-BDO cuando se añadió 3-hidroxibutiraldehído como un sustrato y en las muestras de control sin sustrato. Se muestran los números de GI para las alcohol deshidrogenasas.

La figura 7 muestra concentraciones de 1,3-BDO cuando se añadió 3-hidroxibutiril-CoA como un sustrato y en las muestras de control sin sustrato. Se muestran los números de GI para las alcohol deshidrogenasas. El número de GI para la aldehído deshidrogenasa sometida a prueba conjuntamente es 163762382.

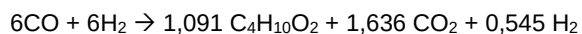
Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere, en parte, a microorganismos que se producen de manera no natural que expresan genes que codifican para enzimas que catalizan la producción de 1,3-butanodiol (1,3-BDO). Las rutas para la producción de 1,3-butanodiol divulgadas en el presente documento se basan en tres precursores: (i) D-alanina, (ii) acetoacetil-CoA y (iii) 4-hidroxibutiril-CoA. La modificación mediante ingeniería de manera satisfactoria de estas rutas conlleva la identificación de un conjunto apropiado de enzimas con suficiente actividad y especificidad, la clonación de sus genes correspondientes en un huésped de producción, la optimización de las condiciones de fermentación, y el

ensayo para determinar la formación de producto tras la fermentación.

La conversión de alanina en 1,3-BDO puede lograrse mediante varias rutas en aproximadamente cinco etapas enzimáticas tal como se muestra en la figura 1. En la primera etapa de todas las rutas (etapa A), se combinan alanina y acetil-CoA mediante 2-amino-4-cetopentanoato tiolasa, una enzima altamente selectiva. El producto de esta reacción, 2-amino-4-oxopentanoato (AKP) entonces puede transaminarse, reducirse, descarboxilarse o desaminarse tal como se muestra en la figura 1. Se comentan etapas de síntesis adicionales para la producción de 1,3-BDO en detalle a continuación. Se calcula que el rendimiento teórico de 1,3-BDO de cada una de estas rutas es de aproximadamente 1,09 mol/mol de glucosa consumido.

La figura 2 expone múltiples rutas para producir 1,3-BDO a partir de acetoacetil-CoA. Cada una de estas rutas a partir de acetoacetil-CoA para dar 1,3-BDO utiliza tres equivalentes reductores y proporciona un rendimiento teórico de 1 mol de 1,3-BDO por mol de glucosa consumido. También pueden usarse otros sustratos de carbono tales como gas de síntesis para la producción de acetoacetil-CoA. La gasificación de glucosa para formar gas de síntesis dará como resultado el máximo rendimiento teórico de 1,09 moles de 1,3-BDO por mol de glucosa consumido, suponiendo que se obtienen 6 moles de CO y 6 moles de H₂ a partir de glucosa



El 4-hidroxibutiril-CoA es un metabolito de partida importante a partir del que pueden prepararse varios compuestos útiles a nivel industrial, incluyendo 1,3-BDO tal como se muestra en la figura 3. Aunque 4-hidroxibutiril-CoA no es un metabolito central altamente común, los solicitantes han descrito previamente métodos para modificar mediante ingeniería cepas que sintetizan 4-hidroxibutiril-CoA en la solicitud de patente estadounidense nº 2009/0075351. La ruta de 4-hidroxibutiril-CoA para dar 1,3-butanodiol tiene un rendimiento teórico de 1,09 mol/mol de rendimiento de producto suponiendo la glucosa como materia prima de hidratos de carbono.

Esta invención también se refiere, en parte, a métodos para producir 1,3-BDO a través del cultivo de estos organismos microbianos que se producen de manera no natural. La deshidratación de 1,3-BDO producida por los organismos y métodos descritos en el presente documento, proporciona una oportunidad para producir butadieno renovable en pequeñas instalaciones de uso final obviando la necesidad de transportar este producto químico inflamable y reactivo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “que se produce de manera no natural” cuando se usa con referencia a un organismo microbiano o microorganismo de la invención pretende significar que el organismo microbiano tiene al menos una alteración genética que no se encuentra normalmente en una cepa que se produce de manera natural de la especie referenciada, incluyendo cepas de tipo natural de la especie referenciada. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican para polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácido nucleico, deleciones de ácido nucleico y/u otra perturbación funcional del material genético microbiano. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones codificantes y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para la especie referenciada. Modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. Los polipéptidos metabólicos a modo de ejemplo incluyen enzimas o proteínas dentro de una ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol.

Una modificación metabólica se refiere a una reacción bioquímica que se altera con respecto a su estado que se produce de manera natural. Por tanto, microorganismos que se producen de manera no natural pueden tener modificaciones genéticas en ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos metabólicos o, fragmentos funcionales de los mismos. Se divulgan modificaciones metabólicas a modo de ejemplo en el presente documento.

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente anaerobio” cuando se usa con referencia a condiciones de crecimiento o cultivo pretende significar que la cantidad de oxígeno es menor de aproximadamente el 10% de saturación para oxígeno disuelto en medios líquidos. El término también pretende incluir cámaras selladas de medio líquido o sólido mantenidas con una atmósfera de menos de aproximadamente el 1% de oxígeno.

“Exógeno” tal como se usa en el presente documento pretende significar que la molécula referenciada o la actividad referenciada se introduce en el organismo microbiano huésped. La molécula puede introducirse, por ejemplo, mediante la introducción de un ácido nucleico codificante en el material genético del huésped tal como mediante integración en un cromosoma del huésped o como material genético no cromosómico tal como un plásmido. Por tanto, el término tal como se usa con 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 con referencia a una actividad de biosíntesis, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo de referencia huésped. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico codificante homólogo o heterólogo que expresa la actividad referenciada tras la introducción en el organismo microbiano huésped. Por tanto, el término “endógeno” se refiere a una molécula o actividad referenciada que está presente en el huésped. De manera similar, el término cuando se usa con referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenido dentro del organismo microbiano. El término “heterólogo” se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente distinta de la especie referenciada mientras que “homólogo” se refiere a una molécula o actividad derivada del organismo microbiano huésped. Por consiguiente, la expresión exógena de un ácido nucleico codificante de la invención puede utilizar cualquier o ambos de un ácido nucleico codificante heterólogo u homólogo.

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

Los expertos en la técnica entenderán que las alteraciones genéticas, incluyendo modificaciones metabólicas ejemplificadas en el presente documento, se describen con referencia a un organismo huésped adecuado tal como *E. coli* y sus reacciones metabólicas correspondientes o un organismo fuente adecuado para el material genético deseado tal como genes para una ruta metabólica adecuada. Sin embargo, dada la secuenciación del genoma completo de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de conocimientos en el área de la genómica, los expertos en la técnica serán capaces de aplicar fácilmente las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento esencialmente a todos los demás organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de *E. coli* ejemplificadas en el presente documento pueden aplicarse inmediatamente a otras especies mediante la incorporación del mismo ácido nucleico codificante o uno análogo de la especie distinta de la especie referenciada. Tales alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, alteraciones genéticas de homólogos de especie, en general, y en particular, desplazamientos de genes ortólogos, parálogos o no ortólogos.

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

Los ortólogos incluyen genes o sus productos génicos codificados que a través de, por ejemplo, evolución, han divergido en cuanto a la estructura o actividad global. Por ejemplo, cuando una especie codifica para un producto génico que presenta dos funciones y cuando tales funciones se han separado en distintos genes en una segunda

especie, se considera que los tres genes y sus productos correspondientes son ortólogos. Para la producción de un producto bioquímico, los expertos en la técnica entenderán que el gen ortólogo que alberga la actividad metabólica que va a introducirse o perturbarse ha de elegirse para la construcción del microorganismo que se produce de manera 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 dentro de una sola especie. Un ejemplo específico es la separación de la proteólisis de elastasa y la proteólisis del plasminógeno, dos tipos de actividad serina proteasa, en distintas moléculas como el activador del plasminógeno y la elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de la actividad 5'-3' exonucleasa de *Mycoplasma* y ADN polimerasa III de *Drosophila*. La ADN polimerasa de la primera especie puede considerarse un ortólogo para cualquiera o ambas de la exonucleasa o la polimerasa de la segunda especie y viceversa.

En cambio, los parálogos son homólogos relacionados mediante, por ejemplo, duplicación seguida por divergencia evolutiva y tienen funciones similares o comunes, pero no idénticas. Los parálogos pueden originarse o derivar de, por ejemplo, la misma especie o de una especie diferente. Por ejemplo, epóxido hidrolasa microsómica (epóxido hidrolasa I) y epóxido hidrolasa soluble (epóxido hidrolasa II) pueden considerarse parálogos porque representan dos enzimas distintas, coevolucionadas a partir de un ancestro común, que catalizan distintas reacciones y tienen distintas funciones en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con similitud de secuencia significativa entre sí que sugieren que son homólogas, o relacionadas a través de coevolución a partir de un ancestro común. Los grupos de familias de proteínas parálogas incluyen homólogos de HipA, genes de luciferasa, peptidasas, y otros.

Un desplazamiento de gen no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituir una función génica referenciada en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, ser capaz de realizar sustancialmente la misma función o una similar en la especie de origen en comparación con la función referenciada en las diferentes especies. Aunque generalmente podrá identificarse un desplazamiento de gen no ortólogo como relacionado estructuralmente con un gen conocido que codifica para la función referenciada, genes menos relacionados estructuralmente pero funcionalmente similares y sus productos génicos correspondientes se encontrarán todavía sin embargo dentro del significado del término tal como se usa en el presente documento. La similitud funcional requiere, por ejemplo, al menos cierta similitud estructural en el sitio activo o la región de unión de un producto génico no ortólogo en comparación con un gen que codifica para la función que trata de sustituirse. Por tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parólogo o un gen no relacionado.

Por tanto, en la identificación y construcción de los organismos microbianos que se producen de manera no natural de la invención que tienen capacidad de biosíntesis de 1,3-BDO, los expertos en la técnica entenderán con la aplicación de las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento a una especie particular que la identificación de modificaciones metabólicas puede incluir la identificación e inclusión o inactivación de ortólogos. En la medida en que están presentes desplazamientos de genes no ortólogos y/o parálogos en el microorganismo referenciado que codifica para una enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, los expertos en la técnica también pueden utilizar estos genes relacionados evolutivamente.

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

Los parámetros a modo de ejemplo para determinar relación de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden ser tal como se exponen a continuación. En resumen, pueden realizarse alineaciones de secuencias de aminoácidos usando 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_caída: 50; valor esperado: 10,0; tamaño de palabra: 3; filtro: activado. Pueden realizarse alineaciones de secuencias de ácido nucleico usando BLASTN versión 2.0.6 (16 de septiembre de 1998) y los siguientes parámetros: emparejamiento: 1; desemparejamiento: -2; apertura de hueco: 5; extensión de hueco: 2; x_caída: 50; valor esperado: 10,0; tamaño de palabra: 11; filtro: desactivado. Los expertos

en la técnica sabrán qué modificaciones pueden realizarse a los parámetros anteriores para o bien aumentar o bien disminuir la rigurosidad de la comparación, por ejemplo, y determinar la relación de dos o más secuencias.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un organismo microbiano que se produce de manera no natural que incluye un organismo microbiano que tiene una ruta de 1,3-butanodiol (1,3-BDO) con al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído) expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-BDO. La ruta de 1,3-BDO incluye una enzima seleccionada del grupo que consiste en una 2-amino-4-cetopentanoato (AKP) tiolasa, una AKP deshidrogenasa, una 2-amino-4-hidroxi-pentanoato aminotransferasa, una 2-amino-4-hidroxi-pentanoato oxidorreductasa (desaminación), una 2-oxo-4-hidroxi-pentanoato descarboxilasa, una 3-hidroxi-butilalaldehído reductasa, una AKP aminotransferasa, una AKP oxidorreductasa (desaminación), una 2,4-dioxopentanoato descarboxilasa, una 3-oxobutiralaldehído reductasa (reducción de cetona), una 3-oxobutiralaldehído reductasa (reducción de aldehído), una 4-hidroxi-2-butanona reductasa, una AKP descarboxilasa, una 4-aminobutan-2-ona aminotransferasa, una 4-aminobutan-2-ona oxidorreductasa (desaminación), una 4-aminobutan-2-ona amoniaco-liasa, a butenona hidratasa, una AKP amoniaco-liasa, una acrilato de acetilo descarboxilasa, una acetoacetyl-CoA reductasa (formación de aldehído, dependiente de CoA), una acetoacetyl-CoA reductasa (formación de alcohol, dependiente de CoA), una acetoacetyl-CoA reductasa (reducción de cetona), una 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído), una 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de alcohol), una 4-hidroxi-butil-CoA deshidratasa y una crotonasa.

Cualquier combinación y cualquier número de las enzimas mencionadas anteriormente puede introducirse en un organismo microbiano huésped para completar una ruta de 1,3-BDO, tal como se ejemplifica en las figuras 1-3. Por ejemplo, el organismo microbiano que se produce de manera no natural puede incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco, hasta todos los ácidos nucleicos en una ruta de 1,3-BDO, codificando cada ácido nucleico para una enzima de la ruta de 1,3-BDO. Tales ácidos nucleicos pueden incluir ácidos nucleicos heterólogos, copias adicionales de genes existentes y elementos reguladores génicos, tal como se explica adicionalmente a continuación. Las rutas de los organismos microbianos que se producen de manera no natural de la invención también se modifican mediante ingeniería de manera adecuada para cultivarse en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

En algunas realizaciones los organismos microbianos que se producen de manera no natural que tienen una ruta de 1,3-BDO incluyen un conjunto de enzimas de la ruta de 1,3-BDO. Un conjunto de enzimas de la ruta de 1,3-BDO representa un grupo de enzimas que pueden convertir alanina, acetoacetyl-CoA o 4-hidroxi-butil-CoA en 1,3-BDO, tal como se muestra en las figuras 1-3.

Los conjuntos a modo de ejemplo de enzimas de la ruta de 1,3-BDO para convertir acetoacetyl-CoA en 1,3-BDO, según la figura 2 incluyen (l) (1) una acetoacetyl-CoA reductasa (reducción de cetona); (2) una 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído); y (3) una 3-hidroxi-butilalaldehído reductasa;

Los conjuntos a modo de ejemplo de enzimas de la ruta de 1,3-BDO para convertir 4-hidroxi-butil-CoA en 1,3-BDO, según la figura 3 incluyen (n) (1) una 4-hidroxi-butil-CoA deshidratasa; (2) una crotonasa; (3) una 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído); y (4) una 3-hidroxi-butilalaldehído reductasa.

La conversión de alanina en 1,3-BDO puede lograrse mediante varias rutas que implican aproximadamente cinco etapas enzimáticas tal como se muestra en la figura 1. En la primera etapa de todas las rutas (etapa A), se combinan alanina y acetyl-CoA por 2-amino-4-cetopentanoato tiolasa, una enzima altamente selectiva. El producto de esta reacción, 2-amino-4-oxopentanoato (AKP) entonces puede transaminarse, reducirse, descarboxilarse o desaminarse tal como se muestra en la figura 1.

En una ruta, AKP se convirtió en 2,4-dioxopentanoato, un 2-cetoácido similar en cuanto a la estructura a alfa-cetoglutarato, por una aminotransferasa u oxidorreductasa de desaminación (etapa B). Luego se convierte 2,4-dioxopentanoato en 3-oxobutiralaldehído por una 2-cetoácido descarboxilasa (etapa C). La reducción de los grupos cetona y aldehído para dar sus alcoholes correspondientes proporciona 1,3-butanodiol. Estas reducciones pueden producirse en cualquier orden para formar los productos intermedios 3-hidroxi-butilalaldehído (etapas O y P) o 4-hidroxi-2-butanona (etapas D y H).

En otra ruta, el grupo 4-oxo de AKP se reduce en primer lugar para dar un alcohol secundario por AKP deshidrogenasa (etapa L). El producto, 2-amino-4-hidroxi-pentanoato, se convierte luego en 2-oxo-4-hidroxi-pentanoato (etapa M). El 2-cetoácido resultante se descarboxila para dar 3-hidroxi-butilalaldehído (etapa N). En la etapa final de esta ruta el aldehído de 3-hidroxi-butilalaldehído se reduce para dar un alcohol primario por 3-hidroxi-butilalaldehído reductasa, formando 1,3-butanodiol (etapa P).

Aún otra ruta implica la descarboxilación de AKP por una aminoácido descarboxilasa (etapa E). El producto de descarboxilación, 4-aminobutan-2-ona, puede o bien transaminarse o bien desaminarse de manera oxidativa para dar 3-oxobutiralaldehído (etapa K) o desaminarse para dar butenona (etapa F). Cuando se forma 3-oxobutiralaldehído, se usan dos etapas de reducción de formación de alcohol para formar 1,3-butanodiol, tal como se describió anteriormente (etapas O y P, o etapas D y H). El producto de desaminación, butenona, se hidroliza luego para dar 4-hidroxi-2-butanona (etapa G), que se reduce para dar 1,3-butanodiol por 4-hidroxi-2-butanona reductasa (etapa H).

Aún otra ruta implica la desaminación de AKP para dar acrilato de acetilo (etapa I). El acrilato de acetilo se descarboxila para dar butenona (etapa J), que luego se convierte en 1,3-butanodiol por butenona hidratasa (etapa G) y 4-hidroxi-2-butanona reductasa (etapa H).

La figura 2 expone múltiples rutas para producir 1,3-butanodiol a partir de acetoacetil-CoA. Una ruta a través de las etapas A, B y C utiliza (i) acetoacetil-CoA reductasa de formación de aldehído, dependiente de CoA para convertir acetoacetil-CoA en 3-oxobutiraldehído (figura 2, etapa A), (ii) 3-oxobutiraldehído reductasa para reducir 3-oxobutiraldehído para dar 3-hidroxibutiraldehído (figura 2, etapa B) y (iii) finalmente, 3-hidroxibutiraldehído reductasa para formar 1,3-butanodiol (figura 2, etapa C).

Alternativamente, puede reducirse acetoacetil-CoA por la acetoacetil-CoA reductasa de formación de aldehído para formar 4-hidroxi-2-butanona (figura 2, etapa D). También puede formarse 4-hidroxi-2-butanona mediante la reducción de 3-oxobutiraldehído por la 3-oxobutiraldehído reductasa de reducción de aldehído (figura 2, etapa E). Eventualmente, puede reducirse 4-hidroxi-2-butanona para formar 1,3-BDO por 4-hidroxi-2-butanona reductasa (figura 2, etapa F).

Aún otro conjunto de rutas de formación de 1,3-BDO se basan en la reducción de acetoacetil-CoA para dar 3-hidroxibutiril-CoA por la acetoacetil-CoA reductasa de reducción de cetona (figura 2, etapa G). Esta enzima reduce la función cetona en acetoacetil-CoA para dar un hidroxilo. Puede reducirse 3-hidroxibutiril-CoA por la 3-hidroxibutiril-CoA reductasa de formación de alcohol bifuncional para formar 1,3-butanodiol (figura 2, etapa I). Alternativamente, puede reducirse en primer lugar para dar 3-hidroxibutiraldehído por la 3-hidroxibutiril-CoA reductasa de formación de aldehído (etapa H) y luego puede reducirse 3-hidroxibutiraldehído tal como se muestra en la etapa C.

Todavía en realizaciones adicionales, el organismo microbiano que se produce de manera no natural tiene un conjunto de enzimas de la ruta de 1,3-BDO que incluye (1) una acetoacetil-CoA reductasa (reducción de cetona); (2) una 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído); y (3) una 3-hidroxibutiraldehído reductasa. Cualquier número de ácidos nucleicos que codifican para estas enzimas puede introducirse en un organismo microbiano huésped que incluye uno, dos y hasta todos de los tres ácidos nucleicos que codifican para estas enzimas. Cuando se introducen uno o dos ácidos nucleicos exógenos, tales ácidos nucleicos pueden ser cualquier permutación de los tres ácidos nucleicos.

4-hidroxibutiril-CoA es un metabolito de partida importante a partir del que pueden prepararse varios compuestos útiles a nivel industrial. Aunque 4-hidroxibutiril-CoA no es un metabolito central altamente común, se han descrito métodos para modificar mediante ingeniería cepas que sintetizan 4-hidroxibutiril-CoA en Burk *et al.* (documento US 20090075351). Un método a modo de ejemplo implica sintetizar 4-hidroxibutiril-CoA a partir de succinil-CoA empleando genes que codifican para actividades semialdehído succínico deshidrogenasa (dependiente de CoA), 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4-hidroxibutirato cinasa y fosfotransbutirilasa.

La primera etapa en la ruta implica la deshidratación de 4-hidroxibutiril-CoA (etapa A, figura 3) seguida por la hidratación de crotonoil-CoA para formar 3-hidroxibutiril-CoA (etapa B). Entonces 3-hidroxibutiril-CoA experimenta dos etapas de reducción para formar 1,3-butanodiol llevadas a cabo por cualquiera de las dos enzimas (etapas C y D) o una sola enzima de función dual (etapa E).

En otras realizaciones, el organismo microbiano que se produce de manera no natural tiene un conjunto de enzimas de la ruta de 1,3-BDO que incluye (1) una 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa; (2) una crotonasa; (3) una 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído); y (4) una 3-hidroxibutiraldehído reductasa. Cualquier número de ácidos nucleicos que codifican para estas enzimas puede introducirse en un organismo microbiano huésped que incluye, uno, dos, tres y hasta todos de los cuatro ácidos nucleicos que codifican para estas enzimas. Cuando se introducen uno, dos o tres ácidos nucleicos exógenos, tales ácidos nucleicos pueden ser cualquier permutación de los cuatro ácidos nucleicos.

En una realización adicional, la invención proporciona un organismo microbiano que se produce de manera no natural que tiene una ruta de 1,3-BDO, en el que el organismo microbiano que se produce de manera no natural comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima o proteína que convierte un sustrato en un producto seleccionado del grupo que consiste en acetoacetil-CoA en 3-hidroxibutiril-CoA, 3-hidroxibutiril-CoA en 3-hidroxibutiraldehído y 3-hidroxibutiraldehído en 1,3-BDO, en el que la enzima o proteína es al menos 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído).

Por tanto, la invención proporciona un organismo microbiano que se produce de manera no natural que contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima o proteína, en el que la enzima o proteína convierte los sustratos y productos de una ruta de 1,3-BDO que convierte acetoacetil-CoA en 1,3-BDO, tal como se ejemplifica mediante las rutas mostradas en la figura 2, en el que la enzima o proteína es al menos 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído).

En una realización adicional, la invención proporciona un organismo microbiano que se produce de manera no

natural que tiene una ruta de 1,3-BDO, en el que el organismo microbiano que se produce de manera no natural comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima o proteína que convierte un sustrato en un producto seleccionado del grupo que consiste en 4-hidroxiutiliril-CoA en crotonoil-CoA, crotonoil-CoA en 3-hidroxiutiliril-CoA, 3-hidroxiutiliril-CoA en 3-hidroxiutiliraldehído, y 3-hidroxiutiliraldehído en 1,3-BDO, en el que la enzima o proteína es al menos 3-hidroxiutiliril-CoA reductasa (formación de aldehído).

Por tanto, la invención proporciona un organismo microbiano que se produce de manera no natural que contiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima o proteína, en el que la enzima o proteína convierte los sustratos y productos de una ruta de 1,3-BDO, convirtiendo la ruta 4-hidroxiutiliril-CoA en 1,3-BDO, tal como se ejemplifica mediante las rutas mostradas en la figura 3, en el que la enzima o proteína es al menos 3-hidroxiutiliril-CoA reductasa (formación de aldehído).

La modificación mediante ingeniería satisfactoria de cualquiera de estas rutas conlleva la identificación de un conjunto apropiado de enzimas con suficiente actividad y especificidad, la clonación de sus genes correspondientes en un huésped de producción, la optimización de las condiciones de fermentación, y el ensayo para determinar la formación de producto tras la fermentación. Para modificar mediante ingeniería un huésped de producción para la producción de cualquiera de los productos mencionados anteriormente, puede(n) expresarse una o más secuencia(s) de ADN exógeno en microorganismos. Además, los microorganismos pueden tener gen(es) endógeno(s) deletado(s) funcionalmente. Estas modificaciones permitirán la producción de 1,3-BDO usando materias primas renovables.

A continuación, se describen varios genes caracterizados bioquímicamente capaces de codificar para enzimas que catalizan cada una de las etapas mostradas en las figuras 1, 2 y 3. Aunque se describe este método para *E. coli*, un experto en la técnica puede aplicar estas enseñanzas a esencialmente cualquier otro organismo. Específicamente, se enumeran genes que son nativos para *E. coli* además de genes en otros organismos que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones apropiadas cuando se clonan y expresan de manera apropiada.

La invención se describe en el presente documento con referencia general a la reacción metabólica, reactante o producto de la misma, o con referencia específica a uno o más ácidos nucleicos o genes que codifican para una enzima asociada con o que cataliza, o una proteína asociada con, la reacción metabólica, el reactante o producto referenciados. A menos que se establezca expresamente de otro modo en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que la referencia a una reacción también constituye la referencia a los reactantes y productos de la reacción. De manera similar, a menos que se establezca expresamente de otro modo en el presente documento, la referencia a un reactante o producto también hace referencia a la reacción, y la referencia a cualquiera de estos constituyentes metabólicos también hace referencia al gen o genes que codifican para las enzimas que catalizan o proteínas implicadas en la reacción, el reactante o producto referenciados. Asimismo, dados los campos bien conocidos de la bioquímica metabólica, enzimología y genómica, la referencia en el presente documento a un gen o ácido nucleico codificante también constituye una referencia a la enzima codificada correspondiente y la reacción que cataliza o una proteína asociada con la reacción así como los reactantes y productos de la reacción.

Todas las transformaciones representadas en las figuras 1-3 se clasifican en las 8 categorías generales de transformaciones mostradas en la tabla 1. A continuación se describen varios genes caracterizados bioquímicamente en cada categoría. Se enumeran específicamente genes que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones apropiadas en las figuras 1-3 cuando se clonan y expresan de manera apropiada. Se proporcionan adicionalmente genes a modo de ejemplo para cada una de las etapas en las figuras 1-3 a continuación en las tablas 35-37.

La tabla 1 muestra los tipos de enzima útiles para convertir productos intermedios metabólicos centrales comunes en 1,3-butanodiol. Los primeros tres dígitos de cada etiqueta corresponden a los primeros tres dígitos del número de la Comisión de Enzimas que indican el tipo general de transformación independiente de la especificidad de sustrato.

Tabla 1

ETIQUETA	FUNCIÓN
1.1.1.a	Oxidoreductasa (cetona en hidroxilo o aldehído en alcohol)
1.1.1.c	Oxidoreductasa (2 etapas, acil-CoA en alcohol)
1.2.1.b	Oxidoreductasa (acil-CoA en aldehído)
1.4.1.a	Oxidoreductasa (desaminación)
2.3.1.b	Aciltransferasa
2.6.1.a	Aminotransferasa
4.1.1.a	Carboxi-liasa
4.2.1.a	Hidro-liasa
4.3.1.a	Amoniaco-liasa

Numerosas transformaciones en las figuras 1, 2 y 3 se clasifican en la categoría de oxidoreductasas que reducen

un aldehído a alcohol. Por ejemplo, las etapas D y P en la figura 1 catalizadas por 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído) y 3-hidroxibutiraldehído reductasa, respectivamente, se clasifican en esta categoría. De manera similar, las etapas C y E en la figura 2 catalizadas por 3-hidroxibutiraldehído reductasa y 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído), respectivamente, son también oxidorreductasas que convierten la funcionalidad aldehído en alcohol.

Las rutas en la figura 3 implican oxidorreductasas tales como 3-hidroxibutiraldehído reductasa en la etapa D.

Los genes a modo de ejemplo que codifican para enzimas que catalizan la conversión de un aldehído en alcohol (es decir, alcohol deshidrogenasa o de manera equivalente aldehído reductasa) incluyen *alrA* que codifica para una alcohol de cadena media deshidrogenasa para C2-C14 (Tani *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 66:5231-5235 (2000)), *ADH2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Atsumi *et al.*, Nature, 451:86-89 (2008)) *yqhD* de *E. coli* que tiene preferencia para moléculas más largas que C3 (Sulzenbacher *et al.*, J. of Molecular Biology, 342:489-502 (2004)) y *bdh I* y *bdh II* de *C. acetobutylicum* que convierte butiraldehído en butanol (Walter *et al.*, J. of Bacteriology, 174:7149-7158 (1992)). El producto génico de *yqhD* cataliza la reducción de acetaldehído, malondialdehído, propionaldehído, butiraldehído y acroleína usando NADPH como cofactor (Perez *et al.*, J. Biol. Chem., 283:7346-7353 (2008)). Se ha demostrado que el producto génico de *adhA* de *Zymomonas mobilis* tiene actividad sobre varios aldehídos incluyendo formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído y acroleína (Kinoshita *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 22:249-254 (1985)). Candidatos a aldehído reductasa adicionales están codificados por *bdh* en *C. saccharoperbutylacetonicum* y *Cbei_1722*, *Cbei_2181* y *Cbei_2421* en *C. beijerinckii*.

Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 2.

Tabla 2

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>alrA</i>	BAB12273.1	9967138	<i>Acinetobacter</i> sp. cepa M-1
<i>ADH2</i>	NP_014032.1	6323961	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>yqhD</i>	NP_417484.1	16130909	<i>Escherichia coli</i>
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>adhA</i>	YP_162971.1	56552132	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>bdh</i>	BAF45463.1	124221917	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>Cbei_1722</i>	YP_001308850	150016596	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>Cbei_2181</i>	YP_001309304	150017050	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>Cbei_2421</i>	YP_001309535	150017281	<i>Clostridium beijerinckii</i>

Enzimas que presentan actividad 3-hidroxibutiraldehído reductasa (EC 1.1.1.61) también se clasifican en esta categoría. Tales enzimas se han caracterizado en *Ralstonia eutropha* (Bravo *et al.*, J. Forensic Sci., 49:379-387 (2004)), *Clostridium kluyveri* (Wolff *et al.*, Protein Expr. Purif., 6:206-212 (1995)) y *Arabidopsis thaliana* (Breitkreuz *et al.*, J. Biol. Chem., 278:41552-41556 (2003)). Aún otro gen es *adhI* de alcohol deshidrogenasa de *Geobacillus thermoglucosidasius* (Jeon *et al.*, J. Biotechnol., 135:127-133 (2008)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 3.

Tabla 3

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>4hbd</i>	YP_726053.1	113867564	<i>Ralstonia eutropha</i> H16
<i>4hbd</i>	L21902.1	146348486	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555
<i>4hbd</i>	Q94B07	75249805	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>adhI</i>	AAR91477.1	40795502	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG

Otra enzima a modo de ejemplo es 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa que cataliza la oxidación reversible de 3-hidroxiisobutirato para dar metilmalonato-semialdehído. Esta enzima participa en la degradación de valina, leucina e isoleucina y se ha identificado en bacterias, eucariotas y mamíferos. La enzima codificada por *P84067* de *Thermus thermophilus* HB8 se ha caracterizado estructuralmente (Lokanath *et al.*, J. Mol. Biol., 352:905-917 (2005)). Se demostró la reversibilidad de la 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa humana usando sustrato marcado isotópicamente (Manning *et al.*, Biochem J., 231:481-484 (1985)). Genes adicionales que codifican para esta enzima incluyen *3hidh* en *Homo sapiens* (Hawes *et al.*, Methods Enzymol., 324:218-228 (2000)) y *Oryctolagus cuniculus* (Hawes *et al.*, citado anteriormente; Chowdhury *et al.*, Biosci. Biotechnol Biochem., 60:2043-2047 (1996)), *mmsB* en *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* (Liao *et al.*, patente estadounidense 20050221466) y *dhat* en *Pseudomonas putida* (Aberhart *et al.*, J. Chem. Soc., 6:1404-1406 (1979); Chowdhury *et al.*, citado anteriormente; Chowdhury *et al.*, Biosci. Biotechnol Biochem., 67:438-441 (2003)). Pueden encontrarse datos relacionados con las

secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 4.

Tabla 4

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
P84067	P84067	75345323	<i>Thermus thermophilus</i>
3hidh	P31937.2	12643395	<i>Homo sapiens</i>
3hidh	P32185.1	416872	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
mmsB	P28811.1	127211	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
mmsB	NP_746775.1	26991350	<i>Pseudomonas putida</i>
dhat	Q59477.1	2842618	<i>Pseudomonas putida</i>

Oxidorreductasas que convierten una funcionalidad cetona en el grupo hidroxilo correspondiente son también etapas de síntesis en las rutas divulgadas. En particular, las reacciones L, O y H en la figura 1 catalizadas por AKP deshidrogenasa, 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de cetona), 4-hidroxi-2-butanona reductasa respectivamente son transformaciones de esta categoría. Las dos últimas transformaciones también se encuentran en las etapas B y F respectivamente en la figura 2. De manera similar, la acetoacetil-CoA reductasa en la etapa G de la figura 2 reduce acetoacetil-CoA en 3-hidroxi-butilil-CoA.

La reducción del grupo 4-oxo de 2-amino-4-oxopentanoato (AKP) por una deshidrogenasa proporciona 2-amino-4-hidroxipentanoato (figura 1, etapa L). Esta reacción es muy similar a la reducción dependiente de NAD(P)H de aspartato-semialdehído para dar homoserina catalizada por homoserina deshidrogenasa (EC 1.1.13). En muchos organismos, incluyendo *E. coli*, la homoserina deshidrogenasa es un enzima bifuncional que también cataliza la conversión dependiente de ATP de aspartato en aspartil-4-fosfato (Starnes *et al.*, *Biochemistry*, 11:677-687 (1973)). Los dominios funcionales son catalíticamente independientes y están conectados por una región de unión (Sibilli *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 256:10228-10230 (1981)) y ambos dominios están sujetos a inhibición alostérica por treonina. El dominio de homoserina deshidrogenasa de la enzima de *E. coli*, codificada por *thrA*, se separó del dominio de aspartato cinasa, se caracterizó y se encontró que presentaba alta actividad catalítica e inhibición reducida por treonina (James *et al.*, *Biochemistry*, 41:3720-3725 (2002)). Esto puede aplicarse a otras treonina cinasas bifuncionales incluyendo, por ejemplo, *hom1* de *Lactobacillus plantarum* (Cahyanto *et al.*, *Microbiology*, 152:205-112 (2006)) y *Arabidopsis thaliana*. Las homoserina deshidrogenasas monofuncionales codificadas por *hom6* en *S. cerevisiae* (Jacques *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 1544:28-41 (2001)) y *hom2* en *Lactobacillus plantarum* (Cahyanto *et al.*, citado anteriormente) se han expresado y caracterizado funcionalmente en *E. coli*. Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 5.

Tabla 5

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>thrA</i>	AAC73113.1	1786183	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>akthr2</i>	O81852	75100442	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>hom6</i>	CAA89671	1015880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>hom1</i>	CAD64819	28271914	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>hom2</i>	CAD63186	28270285	<i>Lactobacillus plantarum</i>

La acetoacetil-CoA reductasa (etapa G, figura 2) que cataliza la reducción de acetoacetil-CoA para dar 3-hidroxi-butilil-CoA participa en la ruta de fermentación de acetil-CoA para dar butirato en varias especies de *Clostridia* y se ha estudiado en detalle (Jones *et al.*, *Microbiol. Rev.*, 50:484-524 (1986)). El enzima de *Clostridium acetobutylicum*, codificada por *hbd*, se ha clonado y expresado funcionalmente en *E. coli* (Youngleson *et al.*, *J. Bacteriol.*, 171:6800-6807 (1989)). Adicionalmente, subunidades de dos complejos de oxidación de ácidos grasos en *E. coli*, codificados por *fadB* y *fadJ*, funcionan como 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas (Binstock *et al.*, *Methods Enzymol.*, 71C:403-411 (1981)). Aún otros genes que se demostró que reducen acetoacetil-CoA para dar 3-hidroxi-butilil-CoA son *phbB* de *Zoogloea ramigera* (Ploux *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 174:177-182 (1988)) y *phaB* de *Rhodobacter sphaeroides* (Alber *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 61:297-309 (2006)). El primer gen es dependiente de NADPH, se ha determinado su secuencia de nucleótidos (Peoples *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 3:349-357 (1989)) y el gen se ha expresado en *E. coli*. Estudios sobre la especificidad de sustrato con el gen condujeron a la conclusión que podría aceptar 3-oxopropionil-CoA como sustrato además de acetoacetil-CoA (Ploux *et al.*, citado anteriormente). Genes adicionales incluyen *Hbd1* (dominio C-terminal) y *Hbd2* (dominio N-terminal) en *Clostridium kluyveri* (Hillmer y Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta*, 3334:12-23 (1974)) y *HSD17B10* en *Bos taurus* (Wakil *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 207:631-638 (1954)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 6.

Tabla 6

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>fadB</i>	P21177.2	119811	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	P77399.1	3334437	<i>Escherichia coli</i>
<i>Hbd2</i>	EDK34807.1	146348271	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	146345976	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>hbd</i>	P52041.2		<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>HSD17B10</i>	O02691.3	3183024	<i>Bos taurus</i>
<i>phbB</i>	P23238.1	130017	<i>Zoogloea ramigera</i>
<i>phaB</i>	YP_353825.1	77464321	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>

Varias enzimas similares se han encontrado en otras especies de *Clostridia* y en *Metallosphaera sedula* (Berg *et al.*, *Archea. Science*, 318:1782-1786 (2007)) tal como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>Hbd</i>	NP_349314.1	NP_349314.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>Hbd</i>	AAM14586.1	AAM14586.1	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	YP_001191505	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	YP_001190500	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	YP_001190490	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	YP_001192057	<i>Metallosphaera sedula</i>

Una alcohol deshidrogenasa a modo de ejemplo que convierte una cetona en un grupo hidroxilo es la alcohol deshidrogenasa secundaria que se mostró que convertía acetona en isopropanol en *C. beijerinckii* (Ismail *et al.*, *J. Bacteriol.*, 175:5097-5105 (1993)) y *T. brockii* (Lamed *et al.*, *Biochem. J.*, 195:183-190 (1981); Peretz *et al.*, *Biochemistry*, 28:6549-6555 (1989)). El producto génico de *adhA* de *Pyrococcus furiosus*, que presenta máxima actividad sobre 2-pentanol y piruvaldehído, se mostró que tiene una especificidad muy amplia que incluye isopropanol y acetona (Van der *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 268:3062-3068 (2001)). Aún otra alcohol deshidrogenasa secundaria con actividad sobre isopropanol y acetona está codificada por el producto génico de *adh-A* de *Rhodococcus ruber* (Edegger *et al.*, *Chem. Commun. (Camb)*, 2402-2404 (2006); Kosjek *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 86:55-62 (2004)). Estos genes junto con otros se enumeran a continuación en la tabla 8.

Tabla 8

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	<i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> HTD4
<i>adhA</i>	AAC25556	3288810	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>adh-A</i>	CAD36475	21615553	<i>Rhodococcus ruber</i>

Alternativamente, existen varias alcohol deshidrogenasas a modo de ejemplo que convierten una cetona en un grupo funcional hidroxilo. Dos de tales enzimas de *E. coli* están codificadas por malato deshidrogenasa (*mdh*) y lactato deshidrogenasa (*ldhA*). Además, se ha mostrado que la lactato deshidrogenasa de *Ralstonia eutropha* demuestra altas actividades sobre sustratos de diversas longitudes de cadena tales como lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (Steinbuchel *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 130:329-334 (1983)). La conversión de la funcionalidad oxo en el grupo hidroxilo también puede estar catalizada por 2-ceto-1,3-butanodiol reductasa, una enzima que se notifica que se encuentra en rata y en placenta humana (Suda *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 176:610-620 (1976); Suda *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77:586-591 (1977)). Todas estas enzimas pueden proporcionar una 3-oxobutiraldehído reductasa, y una 4-hidroxi-2-butanona reductasa. Una enzima adicional para estas etapas es la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa (*bdh*) mitocondrial de corazón humano que se ha clonado y caracterizado (Marks *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:15459-15463 (1992)). Esta enzima es una deshidrogenasa que funciona sobre un 3-hidroxiácido. Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 9.

Tabla 9

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	<i>Homo sapiens</i>

Varios organismos pueden catalizar la reducción de 4-hidroxi-2-butanona para dar 1,3-butanodiol, incluyendo los pertenecientes al género *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Candida* y *Klebsiella* entre otros, tal como describieron Matsuyama *et al.* (1995).

Varias transformaciones en las figuras 2 y 3 se basan en la reducción en dos etapas de acil-CoA para dar el alcohol correspondiente. Por ejemplo, las etapas D e I en la figura 2, que implican la acetoacetyl-CoA reductasa (formación de alcohol, dependiente de CoA) y 3-hidroxi-butilil-CoA reductasa (formación de alcohol) y la etapa E en la figura 3 que implica 3-hidroxi-butilil-CoA reductasa (formación de alcohol), muestran una transformación de este tipo.

Oxidorreductasas en dos etapas a modo de ejemplo que convierten una acil-CoA en alcohol incluyen las que transforman sustratos tales como acetyl-CoA en etanol (por ejemplo, *adhE* de *E. coli* (Kessler *et al.*, FEBS. Lett., 281:59-63 (1991)) y butiril-CoA en butanol (por ejemplo *adhE2* de *C. acetobutylicum* (Fontaine *et al.*, J. Bacteriol., 184:821-830 (2002))). Además de reducir acetyl-CoA para dar etanol, la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* se ha mostrado que oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído para dar isobutiril-CoA (Kazahaya *et al.*, J. Gen. Appl. Microbiol., 18:43-55 (1972); Koo *et al.*, Biotechnol. Lett., 27:505-510 (2005)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 10.

Tabla 10

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	<i>Escherichia coli</i>
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Otra enzima a modo de ejemplo puede convertir malonil-CoA en 3-HP. Una enzima dependiente de NADPH con esta actividad se ha caracterizado en *Chloroflexus aurantiacus* donde participa en el ciclo de 3-hidroxi-propionato (Hugler *et al.*, J. Bacteriol., 184:2404-2410 (2002); Strauss *et al.*, Eur. J. Biochem., 215:633-643 (1993)). Esta enzima, con una masa de 300 kDa, es altamente específica de sustrato y muestra poca similitud de secuencia con otras oxidorreductasas conocidas (Hugler *et al.*, citado anteriormente). No se han mostrado enzimas en otros organismos que catalicen esta reacción específica; sin embargo existen evidencias bioinformáticas de que otros organismos pueden tener rutas similares (Klatt *et al.*, Environ. Microbiol., 9:2067-2078 (2007)). Pueden deducirse enzimas en otros organismos incluyendo *Roseiflexus castenholzii*, *Erythrobacter* sp. NAP1 y proteobacteria gamma marina HTCC2080 por similitud de secuencia. Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 11.

Tabla 11

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>mcr</i>	AAS20429.1	42561982	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
<i>Rcas_2929</i>	YP_001433009.1	156742880	<i>Roseiflexus castenholzii</i>
<i>NAP1_02720</i>	ZP_01039179.1	85708113	<i>Erythrobacter</i> sp. NAP1
<i>MGP2080_00535</i>	ZP_01626393.1	119504313	Proteobacteria gamma marina HTCC2080

Pueden reducirse moléculas de acil-CoA de cadena más larga por enzimas tales como la FAR de jojoba (*Simmondsia chinensis*) que codifica para una acil graso-CoA reductasa de formación de alcohol. Su sobreexpresión en *E. coli* dio como resultado actividad FAR y la acumulación de alcohol graso (Metz *et al.*, Plant Physiology, 122:635-644 (2000)) (FAR, AAD38039.1, 5020215, *Simmondsia chinensis*).

Las rutas divulgadas en el presente documento implican numerosas transformaciones de tipo oxidorreductasa que convierten una acil-CoA en un aldehído. Específicamente, las etapas A y H en la figura 2 catalizadas por acetoacetyl-CoA reductasa (formación de aldehído) y 3-hidroxi-butilil-CoA reductasa (formación de aldehído) y la etapa C de la figura 3 que muestran la transformación catalizada por 3-hidroxi-butilil-CoA reductasa.

Varias acil-CoA deshidrogenasas son capaces de reducir una acil-CoA para dar su aldehído correspondiente. Los genes a modo de ejemplo que codifican para tales enzimas incluyen el *acr1* de *Acinetobacter calcoaceticus* que codifica para una acil graso-CoA reductasa (Reiser *et al.*, J. of Bacteriology, 179:2969-2975 (1997)), la acil graso-CoA reductasa de *Acinetobacter* sp. M-1 (Ishige *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 68:1192-1195 (2002)) y una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA y NADP codificada por el gen *sucD* en *Clostridium kluyveri* (Sohling *et al.*, J. Bacteriol., 178:871-880 (1996)). *SucD* de *P. gingivalis* es otra succinato-semialdehído deshidrogenasa (Takahashi *et al.*, J. Bacteriol., 182:4704-4710 (2000)). La enzima acetaldehído deshidrogenasa de acilación en *Pseudomonas* sp, codificada por *bphG*, es aún otra enzima que se ha demostrado que oxida y acila acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído (Powlowski *et al.*, J. Bacteriol.,

175:377-385 (1993)). Además de reducir acetil-CoA para dar etanol, la enzima codificada por *adhE* en *Leuconostoc mesenteroides* se ha mostrado que oxida el compuesto de cadena ramificada isobutiraldehído para dar isobutiril-CoA (Kazahaya *et al.*, citado anteriormente; Koo *et al.*, citado anteriormente). La butiraldehído deshidrogenasa cataliza una reacción similar, la conversión de butiril-CoA en butiraldehído, en organismos solventogénicos tales como *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71:58-61 (2007)). Se encuentran candidatos a enzima aldehído deshidrogenasa adicionales en *Desulfatibacillum alkenivorans*, *Citrobacter koseri*, *Salmonella enterica*, *Lactobacillus brevis* y *Bacillus selenitireducens*. Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 12.

Tabla 12

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>acrl</i>	YP_047869.1	50086359	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>acrl</i>	AAC45217	1684886	<i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>acrl</i>	BAB85476.1	18857901	<i>Acinetobacter</i> sp. cepa M-1
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	<i>Pseudomonas</i> sp
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ald</i>	ACL06658.1	218764192	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01
<i>ald</i>	YP_001452373	157145054	<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895
<i>pduP</i>	NP_460996.1	16765381	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium
<i>pduP</i>	ABJ64680.1	116099531	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
<i>BseIDRAFT_1651</i>	ZP_02169447	163762382	<i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10

Un tipo de enzima adicional que convierte una acil-CoA en su aldehído correspondiente es malonil-CoA reductasa que transforma malonil-CoA en semialdehído malónico. La malonil-CoA reductasa es una enzima clave en la fijación autótrofa de carbono mediante el ciclo de 3-hidroxiisovalerato en arqueobacterias termoacidófilas (Berg *et al.*, citado anteriormente; Thauer, R.K., *Science*, 318:1732-1733 (2007)). La enzima utiliza NADPH como cofactor y se ha caracterizado en *Metallosphaera* y *Sulfolobus* spp (Alber *et al.*, *J. Bacteriol.*, 188:8551-8559 (2006); Hugler *et al.*, citado anteriormente). La enzima está codificada por *Msed_0709* en *Metallosphaera sedula* (Alber *et al.*, citado anteriormente; Berg *et al.*, citado anteriormente). Un gen que codifica para una malonil-CoA reductasa de *Sulfolobus tokodaii* se clonó y expresó heterológicamente en *E. coli* (Alber *et al.*, citado anteriormente). También se ha mostrado que esta enzima cataliza la conversión de metilmalonil-CoA en su aldehído correspondiente (2007). Aunque la funcionalidad aldehído deshidrogenasa de estas enzimas es similar a la deshidrogenasa bifuncional de *Chloroflexus aurantiacus*, existe poca similitud de secuencia. Ambas enzimas malonil-CoA reductasa tienen alta similitud de secuencia con aspartato-semialdehído deshidrogenasa, una enzima que cataliza la reducción y desfosforilación simultánea de aspartil-4-fosfato para dar aspartato-semialdehído. Pueden encontrarse genes adicionales por homología de secuencia con proteínas en otros organismos incluyendo *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius* y se han enumerado a continuación. Aún otra enzima para aldehído deshidrogenasa de acilación de CoA es el gen *ald* de *Clostridium beijerinckii* (Toth *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4973-4980 (1999)). Se ha notificado que esta enzima reduce acetil-CoA y butiril-CoA para dar sus aldehídos correspondientes. Este gen es muy similar a *eutE* que codifica para acetaldehído deshidrogenasa de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Toth *et al.*, citado anteriormente). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 13.

Tabla 13

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>MSED_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>mcr</i>	NP_378167.1	15922498	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
<i>Ald</i>	AAT66436	9473535	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>eutE</i>	P77445	2498347	<i>Escherichia coli</i>

La desaminación oxidativa de grupos amino para dar sus grupos oxo correspondientes está catalizada por oxidorreductasas de desaminación en la clase de EC 1.4.1. Tales enzimas utilizan NAD⁺, NADP⁺ o FAD⁺ como aceptor. Las enzimas en esta clase pueden convertir 2-amino-4-oxopentanoato en 2,4-dioxopentanoato (figura 1, etapa B), 2-amino-4-hidroxipentanoato en 2-oxo-4-hidroxipentanoato (figura 1, etapa M) y 4-aminobutan-2-ona en 3-oxobutiraldehído (figura 1, etapa K). Oxidorreductasas a modo de ejemplo que actúan sobre sustratos similares incluyen glutamato deshidrogenasa (desaminación), codificada por *gdhA*, leucina deshidrogenasa (desaminación),

codificada por *ldh*, y aspartato deshidrogenasa (desaminación), codificada por *nadX*. El producto génico de *gdhA* de *Escherichia coli* (McPherson et al., *Nucleic.Acids Res.* 11:5257-5266 (1983); Korber et al., *J.Mol.Biol.* 234:1270-1273 (1993)), *gdh* de *Thermotoga maritima* (Kort et al., *Extremophiles* 1:52-60 (1997); Lebbink et al., *J. Mol. Biol.* 280:287-296 (1998); Lebbink et al., *J.Mol.Biol.* 289:357-369 (1999)) y *gdhA1* de *Halobacterium salinarum* (Ingoldsby et al., *Gene.* 349:237-244 (2005)) catalizan la interconversión reversible de glutamato en 2-oxoglutarato y amoníaco, al tiempo que favorecen NADP(H), NAD(H), o ambos, respectivamente. Se encuentran candidatos a gen de glutamato deshidrogenasa adicionales en *Bacillus subtilis* (Khan et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 69:1861-1870 (2005)), *Nicotiana tabacum* (Purnell et al., *Planta* 222:167-180 (2005)), *Oryza sativa* (Abiko et al., *Plant Cell Physiol* 46:1724-1734 (2005)), *Haloferax mediterranei* (Diaz et al., *Extremophiles.* 10:105-115 (2006)), *Halobactreium salinarum* (Hayden et al., *FEMS Microbiol Lett.* 211:37-41 (2002)) y levaduras (Roca et al., *Appl Environ. Microbiol* 69:4732-4736 (2003)). La enzima de *Nicotiana tabacum* se compone de subunidades alfa y beta codificadas por *gdh1* y *gdh2* (Purnell et al., *Planta* 222:167-180 (2005)). El gen *ldh* gen *Bacillus cereus* codifica para la proteína LeuDH que acepta una amplia gama de sustratos incluyendo leucina, isoleucina, valina y 2-aminobutanoato (Stoyan et al., *J.Biotechnol* 54:77-80 (1997); Ansorge et al., *Biotechnol Bioeng.* 68:557-562 (2000)). El gen *nadX* de *Thermotoga maritima* que codifica para la aspartato deshidrogenasa está implicado en la biosíntesis de NAD (Yang et al., *J.Biol.Chem.* 278:8804-8808 (2003)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando the números de registro de GenBank mostrados a continuación en la tabla 14.

Tabla 14

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>gdhA</i>	P00370	118547	<i>Escherichia coli</i>
<i>gdh</i>	P96110.4	6226595	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	15789827	<i>Halobacterium salinarum</i>
<i>rocG</i>	NP_391659.1	16080831	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>gdh1</i>	AAR11534.1	38146335	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>gdh2</i>	AAR11535.1	38146337	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>GDH</i>	Q852M0	75243660	<i>Oryza sativa</i>
<i>GDH</i>	Q977U6	74499858	<i>Haloferax mediterranei</i>
<i>GDH</i>	P29051	118549	<i>Halobactreium salinarum</i>
<i>GDH2</i>	NP_010066.1	6319986	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ldh</i>	P0A393	61222614	<i>Bacillus cereus</i>
<i>nadX</i>	NP_229443.1	15644391	<i>Thermotoga maritima</i>

Se requiere una enzima con actividad 4-aminobutan-2-ona oxidorreductasa (desaminación) para convertir 4-aminobutan-2-ona en su aldehído correspondiente (figura 1, etapa K). Los candidatos a modo de ejemplo incluyen 3,5-diaminohexanoato deshidrogenasa (EC 1.4.1.11) y lisina 6-deshidrogenasa (EC 1.4.1.18). La 3,5-diaminohexanoato deshidrogenasa interconvierte 3-aminoácidos y 3-oxoácidos y se ha caracterizado en organismos que fermentan lisina. El gen que codifica para 3,5-diaminohexanoato deshidrogenasa, *kdd*, se identificó recientemente en *Fusobacterium nucleatum* (Kreimeyer et al., *J Biol.Chem.* 282:7191-7197 (2007)). La enzima se ha purificado y caracterizado en otros organismos (Baker et al., *J Biol. Chem.* 247:7724-7734 (1972); Baker et al., *Biochemistry* 13:292-299 (1974)) pero los genes asociados con estas enzimas no se conocen. Pueden deducirse candidatos en otros organismos secuenciados por homología de secuencia. La lisina 6-deshidrogenasa, codificada por los genes *lysDH*, cataliza la conversión de aminas primarias en sus aldehídos correspondientes. Esta enzima cataliza de manera natural la desaminación oxidativa reversible del grupo 6-amino de L-lisina para formar 2-aminoadipato-6-semialdehído (Misono et al., *J Bacteriol.* 150:398-401 (1982)). Se encuentran enzimas a modo de ejemplo en *Geobacillus stearothermophilus* (Heydari et al., *Appl Environ. Microbiol* 70:937-942 (2004)), *Agrobacterium tumefaciens* (Hashimoto et al., *J Biochem.* 106:76-80 (1989); Misono y Nagasaki, *J Bacteriol* 150:398-401 (1982)) y *Achromobacter denitrificans* (Ruldeekulthamrong et al., *BMB.Rep.* 41:790-795 (2008)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 15.

Tabla 15

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>kdd</i>	AAL93966.1	19713113	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>lysDH</i>	BAB39707	13429872	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>lysDH</i>	NP_353966	15888285	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>lysDH</i>	AAZ94428	74026644	<i>Achromobacter denitrificans</i>

La 2-amino-4-oxopentanoato (AKP) tiolasa o AKP tiolasa (AKPT) (etapa 1, figura 1) es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal que participa en la degradación de ornitina en *Clostridium sticklandii* (Jeng et al., *A. Biochemistry*, 13:2898-2903 (1974); Kenkies et al., *Microbiology*, 145:819-826 (1999)). Una agrupación de genes que codifica para las subunidades alfa y beta de AKPT (*or-2* (*ortA*) y *or-3* (*ortB*)) se identificó recientemente y se caracterizaron las

propiedades bioquímicas de la enzima (Fonknechten *et al.*, *J. Bacteriol.*, en impresión (2009)). La enzima es capaz de actuar en ambos sentidos y reacciona con el isómero D de alanina. Puede realizarse modificación mediante ingeniería de enzimas para optimizar la función con L-alanina como sustrato. Se ha caracterizado AKPT de *Clostridium sticklandii* pero su secuencia de proteína no se ha publicado aún. Se encuentran enzimas con alta homología de secuencia en *Clostridium difficile*, *Alkaliphilus metalliredigenes* QYF, *Thermoanaerobacter* sp. X514 y *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 (Fonknechten *et al.*, citado anteriormente). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 16.

Tabla 16

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>ortA</i> (A)	YP_001086914.1	126698017	<i>Clostridium difficile</i> 630
<i>ortB</i> (β)	YP_001086915.1	126698018	<i>Clostridium difficile</i> 630
<i>Amet_2368</i> (α)	YP_001320181.1	150390132	<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYF
<i>Amet_2369</i> (β)	YP_001320182.1	150390133	<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYF
<i>Teth514_1478</i> (α)	YP_001663101.1	167040116	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514
<i>Teth514_1479</i> (β)	YP_001663102.1	167040117	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514
<i>TTE1235</i> (α)	NP_622858.1	20807687	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4
<i>thrC</i> (β)	NP_622859.1	20807688	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4

La conversión de 2-amino-4-oxopentanoato (AKP) en 2,4-dioxopentanoato (etapa B, figura 1) se logra por 2-amino-4-oxopentanoato aminotransferasa u oxidorreductasa (desaminación). La selección de una enzima apropiada para esta transformación depende de la estereoquímica del sustrato. Por ejemplo, si el sustrato está en la configuración D, puede utilizarse una D-aminoácido aminotransferasa (EC 2.6.1.21), mientras que el estereoisómero L puede utilizar una L-amino transferasa tal como aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1).

La aspartato aminotransferasa transfiere un grupo amino de aspartato a alfa-cetoglutarato, formando glutamato y oxaloacetato. El aspartato tiene estructura similar a 2-amino-4-oxopentanoato. Esta conversión está catalizada, por ejemplo, por los productos génicos de *aspC* de *Escherichia coli* (Yagi *et al.*, *FEBS Lett.*, 100:81-84 (1979); Yagi *et al.*, *Methods Enzymol.*, 133:83-89 (1985)), *AAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Yagi *et al.*, *J. Biochem.*, 92:35-43 (1982)) y *ASP5* de *Arabidopsis thaliana* (Kwok *et al.*, *J. Exp. Bot.*, 55:595-604 (2004); De la *et al.*, *Plant J.*, 46:414-425 (2006); Wilkie *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 12:381-389 (1998)). Se ha mostrado que la enzima de *Rattus norvegicus* transamina sustratos alternativos tales como ácido 2-aminohexanodioico y ácido 2,4-diaminobutírico (Recasens *et al.*, *Biochemistry*, 19:4583-4589 (1980)). Las aminotransferasas que actúan sobre otros sustratos de tipo aminoácido también pueden catalizar esta transformación. La valina aminotransferasa cataliza la conversión de valina y piruvato en 2-cetoisovalerato y alanina. El gen de *E. coli*, *avtA*, codifica para una enzima de este tipo (Whalen *et al.*, *J. Bacteriol.*, 150:739-746 (1982)). Este producto génico también cataliza la aminación de α-cetobutirato para generar α-aminobutirato, aunque el donador de amina en esta reacción no se ha identificado (Whalen *et al.*, *J. Bacteriol.*, 158:571-574 (1984)). Un candidato adicional es alfa-amino adipato transaminasa (EC 2.6.1.39), una enzima que participa en la biosíntesis y degradación de lisina en algunos organismos. La enzima de *Thermus thermophilus*, codificada por *lysN*, es activa con varios sustratos alternativos incluyendo oxaloacetato, 2-oxoisocaproato, 2-oxoisovalerato y 2-oxo-3-metilvalerato (Miyazaki *et al.*, *Microbiol.* 150:2327-2334 (2004)). Se ha caracterizado una enzima similar de *Homo sapiens* (Okuno *et al.*, *Enz. Prot.* 47:136-148 (1993)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 17.

Tabla 17

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>aspC</i>	NP_415448.1	16128895	<i>Escherichia coli</i>
<i>AAT2</i>	P23542.3	1703040	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ASP5</i>	P46248.2	20532373	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>got2</i>	P00507	112987	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>avtA</i>	YP_026231.1	49176374	<i>Escherichia coli</i>
<i>lysN</i>	BAC76939.1	31096548	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>AadAT-II</i>	Q8N5Z0.2	46395904	<i>Homo sapiens</i>

Cuando el sustrato está presente como el estereoisómero D, la transaminación puede estar catalizada por D-amino transferasa (EC 2.6.1.21), también conocida como D-aminoácido aminotransferasa y D-alanina aminotransferasa (DAAT). Esta clase de enzimas destaca por su amplia especificidad de sustrato, que es específica de la especie. La D-amino transferasa de la especie de *Bacillus* YM-1, codificada por *dat*, se ha clonado, secuenciado (Tanizawa *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:2450-2454 (1989)) y se ha resuelto la estructura cristalina (Peisach *et al.*, *Biochemistry*, 37:4958-4967 (1998)). Esta enzima también ha sido objeto de estudios de modificación

mediante ingeniería de proteínas para alterar la especificidad de sustrato (Gutierrez *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 267:7218-7223 (2000); Gutierrez *et al.*, *Protein Eng.*, 11:53-58 (1998)). Se encuentran genes adicionales en *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 (Taylor *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1350:38-40 (1997)), *Staphylococcus haemolyticus* (Pucci *et al.*, *J. Bacteriol.*, 177:336-342 (1995)) y *Bacillus subtilis* (Martinez-Carrion *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 240:3538-3546 (1965)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 18.

Tabla 18

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>dat</i>	P19938	118222	<i>Bacillus</i> sp. YM-1
<i>dat</i>	P54692	1706292	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 10716
<i>dat</i>	P54694	1706294	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>dat</i>	O07597.1	3121979	<i>Bacillus subtilis</i>

En la reacción K de la figura 1, se transamina 4-aminobutan-2-ona para formar 3-oxobutanal. Esta transformación puede estar catalizada asimismo por una aminotransferasa que interconvierte aldehídos y aminos terminales. Enzimas candidato a modo de ejemplo son beta-alanina/alfa-cetoglutarato aminotransferasa, GABA aminotransferasa, 3-amino-2-metilpropionato transaminasa, lisina-6-aminotransferasa, 2,4-diaminobutanoato transaminasa, putrescina aminotransferasa y diamina aminotransferasa.

Cargill ha desarrollado y patentado una beta-alanina/alfa-cetoglutarato aminotransferasa para producir 3-HP a partir de beta-alanina mediante malonil-semialdehído (Chandra *et al.*, *Arch. Microbiol.*, 176:443-451 (2001)). También se mostró que el producto génico de SkPYD4 en *Saccharomyces kluyveri* usa preferentemente beta-alanina como donador de grupo amino (Aberhart *et al.*, *J. Chem. Soc.* 6:1404-1406 (1979)). SkUGA1 codifica para un homólogo de GABA aminotransferasa de *Saccharomyces cerevisiae*, UGA1 (Ichikawa *et al.*, *J. Mol. Catalysis A-Chem.*, 256:106-112 (2006)), mientras que SkPYD4 codifica para una enzima implicada en la transaminación tanto de β -alanina como de GABA (Aberthart *et al.*, *Supra*). La 3-amino-2-metilpropionato transaminasa cataliza la transformación de metilmalonato-semialdehído en 3-amino-2-metilpropionato. La enzima se ha caracterizado en *Rattus norvegicus* y *Sus scrofa* y está codificada por Abat (Chopra *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 25:533-540 (2002), Kuznetsova *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 29:263-279 (2005)). Los candidatos a enzima en otros organismos con alta homología de secuencia con 3-amino-2-metilpropionato transaminasa incluyen *Gta-1* en *C. elegans* y *gabT* en *Bacillus subtilis*. Adicionalmente, se ha mostrado que una de las GABA aminotransferasas nativas en *E. coli*, codificada por el gen *gabT*, tiene amplia especificidad de sustrato (Fontaine *et al.*, *J. Bacteriol.*, 184:821-830 (2002), Kanamasa *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80:223-229 (2008)). El gen *puuE* codifica para la otra 4-aminobutirato transaminasa en *E. coli* (Drummond *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 235:318-325 (1960)).

La lisina-6-aminotransferasa convierte lisina en alfa-aminoadipato-semialdehído. Las enzimas candidatas se han caracterizado en *Candida utilis* (Hammer *et al.*, *J Basic Microbiol* 32:21-27 (1992)), *Flavobacterium lutescens* (Fujii *et al.*, *J Biochem.* 128:391-397 (2000)) y *Streptomyces clavuligenus* (Romero *et al.*, *J Ind. Microbiol Biotechnol* 18:241-246 (1997)). Se expresó funcionalmente una lisina-6-aminotransferasa recombinante de *S. clavuligenus* en *E. coli* (Tobin *et al.*, *J Bacteriol.* 173:6223-6229 (1991)). La enzima de *F. lutescens* es específica para alfa-cetoglutarato como aceptor de amino (Soda *et al.*, *Biochemistry* 7:4110-4119 (1968)). Una enzima con actividad diaminobutanoato transaminasa está codificada por el producto génico de *dat* en *Acinetobacter baumannii* (Ikai *et al.*, *J Bacteriol.* 179:5118-5125 (1997)). Además de su sustrato natural, 2,4-diaminobutirato, DAT transamina las aminos terminales de lisina, 4-aminobutirato y ornitina. Las enzimas candidatas a putrescina aminotransferasa están codificadas por *ygjG* en *E. coli* y *spuC* de *Pseudomonas aeruginosa* (Lu *et al.*, *J Bacteriol.* 184:3765-3773 (2002)). El producto génico de *ygjG* reacciona con los sustratos alternativos cadaverina, espermidina y 1,7-diaminoheptanoato (Samsonova *et al.*, *BMC. Microbiol* 3:2 (2003); Kim, *J Biol.Chem.* 239:783-786 (1964)).

Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 19.

Tabla 19

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	98626772	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>SkUGA1</i>	ABF58894.1	98626792	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>UGA1</i>	NP_011533.1	6321456	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Abat</i>	P50554.3	122065191	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Abat</i>	P80147.2	120968	<i>Sus scrofa</i>
<i>Gta-1</i>	Q21217.1	6016091	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>gabT</i>	P94427.1	6016090	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>gabT</i>	P22256.1	16130576	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>puuE</i>	NP_415818.1	16129263	<i>Escherichia coli</i> K12

lat	BAB13756.1	10336502	<i>Flavobacterium lutescens</i>
lat	AAA26777.1	153343	<i>Streptomyces clavuligenus</i>
dat	P56744.1	6685373	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ygjG	NP_417544	145698310	<i>Escherichia coli</i>
spuC	AAG03688	9946143	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

En la figura 1, etapa C, se descarboxila 2,4-dioxopentanoato para formar 3-oxobutiraldehído por 2,4-dioxopentanoato descarboxilasa. El 2,4-dioxopentanoato es similar a los sustratos nativos de piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) y benzoilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7). La piruvato descarboxilasa (PDC), también denominada ceto-ácido descarboxilasa, es una enzima clave en la fermentación alcohólica, que cataliza la descarboxilación de piruvato para dar acetaldehído. La enzima de *Saccharomyces cerevisiae* tiene una amplia variedad de sustrato para 2-cetoácidos alifáticos incluyendo 2-cetobutirato, 2-cetovalerato, 3-hidroxipiruvato y 2-fenilpiruvato (Li *et al.*, *Biochemistry*, 38:10004-10012 (1999)). Esta enzima se ha estudiado extensamente, modificado mediante ingeniería para presentar actividad alterada, y expresado funcionalmente en *E. coli* (Killenberg-Jabs *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 268:1698-1704 (2001); Li *et al.*, citado anteriormente; Schure *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1303-1307 (1998)). La PDC de *Zymomonas mobilis*, codificada por *pdc*, también tiene una amplia variedad de sustrato y ha sido objeto de estudios de modificación mediante ingeniería dirigidos para alterar la afinidad por diferentes sustratos (Siegert *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 18:345-357 (2005)). La estructura cristalina de esta enzima está disponible (Killenberg-Jabs, citado anteriormente). Otras enzimas PDC bien caracterizadas incluyen las enzimas de *Acetobacter pasteurians* (Chandra *et al.*, *Arch. Microbiol.* 176:443-451 (2001)) y *Kluyveromyces lactis* (Krieger *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 269:3256-3263 (2002)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 20.

Tabla 20

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>pdc</i>	P06672.1	118391	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>pdc1</i>	P06169	30923172	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>pdc</i>	Q8L388	20385191	<i>Acetobacter pasteurians</i>
<i>pdc1</i>	Q12629	52788279	<i>Kluyveromyces lactis</i>

Como PDC, la benzoilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7) tiene una amplia variedad de sustrato y ha sido el objetivo de estudios de modificación mediante ingeniería de enzimas. La enzima de *Pseudomonas putida* se ha estudiado extensamente y están disponibles las estructuras cristalinas de esta enzima (Polovnikova *et al.*, *Biochemistry* 42:1820-1830 (2003); Hasson *et al.*, *Biochemistry*, 37:9918-9930 (1998)). La mutagénesis dirigida al sitio de dos residuos en el sitio activo de la enzima de *Pseudomonas putida* alteró la afinidad (Km) de sustratos que se producen y no se producen de manera natural (Siegert *et al.*, citado anteriormente). Las propiedades de esta enzima se han modificado adicionalmente mediante modificación mediante ingeniería dirigida (Lingen *et al.*, *ChemBiochem*, 4:721-726 (2003); Lingen *et al.*, *Protein Eng.*, 15:585-593 (2002)). La enzima de *Pseudomonas aeruginosa*, codificada por *mdlC*, también se ha caracterizado experimentalmente (Barrowman *et al.*, *FEMS Microbiology Letters*, 34:57-60 (1986)). Pueden deducirse genes adicionales de *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* y otros organismos por homología de secuencia o identificarse usando un sistema de selección de crecimiento desarrollado en *Pseudomonas putida* (Henning *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:7510-7517 (2006)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 21.

Tabla 21

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>mdlC</i>	P20906.2	3915757	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>mdlC</i>	Q9HUR2.1	81539678	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>dpgB</i>	ABN80423.1	126202187	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>ilvB-1</i>	YP_260581.1	70730840	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Una tercera enzima capaz de descarboxilar 2-oxoácidos es la alfa-cetoglutarato descarboxilasa (KGD). La variedad de sustrato de esta clase de enzimas no se ha estudiado hasta la fecha. La KDC de *Mycobacterium tuberculosis* (Tian *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:10670-10675 (2005)) se ha clonado y se ha expresado funcionalmente en *E. coli* en Genomática. Se ha detectado actividad enzimática de KDC en varias especies de *Rhizobia* incluyendo *Bradyrhizobium japonicum* y *Mesorhizobium loti* (Green *et al.*, *J. Bacteriol.*, 182:2838-2844 (2000)). Aunque no se ha(n) aislado el/los gen(es) que codifica(n) para KDC en estos organismos, están disponibles las secuencias genómicas y se anotan varios genes en cada genoma como supuestas KDC. También se ha caracterizado una KDC de *Euglena gracilis* pero el gen asociado con esta actividad no se ha identificado hasta la fecha (Shigeoka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 288:22-28 (1991)). Se secuenciaron los primeros veinte aminoácidos empezando en el extremo N-terminal MTYKAPVKDVKFLLDKVFVKV (Shigeoka *et al.*, citado anteriormente). El gen puede identificarse

sometiendo a prueba genes que contienen esta secuencia N-terminal para determinar la actividad KDC. Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 22.

5

Tabla 22

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>kgd</i>	050463.4	160395583	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>kgd</i>	NP_767092.1	27375563	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110
<i>kgd</i>	NP_105204.1	13473636	<i>Mesorhizobium loti</i>

Una cuarta enzima para catalizar esta etapa es la alfa-cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada (BCKA). Se ha mostrado que esta clase de enzimas actúa sobre una variedad de compuestos de longitud de cadena variable de 3 a 6 carbonos (Oku *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:18386-18396 (1988); Smit *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:303-311 (2005)). Se ha caracterizado la enzima en *Lactococcus lactis* en una variedad de sustratos ramificados y lineales incluyendo 2-oxobutanoato, 2-oxohexanoato, 2-oxopentanoato, 3-metil-2-oxobutanoato, 4-metil-2-oxobutanoato e isocaproato (Smit *et al.*, citado anteriormente). La enzima se ha caracterizado estructuralmente (Berthold *et al.*, *D. Biol. Crystallogr.*, 63:1217-1224 (2007)). Alineaciones de secuencias entre la enzima de *Lactococcus lactis* y la piruvato descarboxilasa de *Zymomonas mobilis* indican que los residuos catalíticos y de reconocimiento de sustrato son casi idénticos (Siegert *et al.*, citado anteriormente), de modo que esta enzima es fácilmente propicia para la modificación mediante ingeniería dirigida. Pueden identificarse genes de BCKA adicionales por homología con la secuencia de proteína de *Lactococcus lactis* (*kdcA*, AAS49166.1, 44921617, *Lactococcus lactis*). Muchos de los emparejamientos de BLASTp de alta puntuación para esta enzima se anotan como indolpiruvato descarboxilasas (EC 4.1.1.74). La indolpiruvato descarboxilasa (IPDA) es una enzima que cataliza la descarboxilación de indolpiruvato para dar indolacetaldehído en plantas y bacterias de plantas.

Se descarboxila 2-amino-4-cetopentanoato para formar 4-aminobutan-2-ona por AKP descarboxilasa en la etapa E de la figura 1. Esta transformación puede estar catalizada por una aminoácido descarboxilasa. La selección de una descarboxilasa apropiada depende de la configuración estereoquímica del 4-amino-4-oxopentanoato. Cuando este compuesto está en una configuración D, puede utilizarse una D-aminoácido descarboxilasa. Una D-aminoácido descarboxilasa de este tipo es diaminopimelato descarboxilasa (DDC, EC 4.1.1.20). Esta enzima descarboxila el D-estereocentro de meso-diaminopimelato, que cataliza la etapa final de la biosíntesis de lisina. Se ha estudiado DDC en muchos organismos incluyendo *E. coli* (Momany *et al.*, *D. Biol. Crystallogr.*, 58:549-552 (2002)), *Mycobacterium tuberculosis* (Kefala *et al.*, *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 61:782-784 (2005); Gokulan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278:18588-18596 (2003); Andersen *et al.*, *Gene*, 124:105-109 (1993)), *Methylophilus methylotrophus* (Tsujiimoto *et al.*, *J. Biotechnol.*, 124:327-337 (2006)) y *Helicobacter pylori* (Hu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 283:21284-21293 (2008)). Alternativamente, la ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17) de *Homo sapiens* tiene una débil actividad sobre el isómero D de ornitina (Qu *et al.*, *Biochem. J.*, 375:465-470 (2003); Fitzgerald *et al.*, *DNA*, 8:623-634 (1989)) y puede usarse para la descarboxilación en la etapa E. Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 23.

40

Tabla 23

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>lysA</i>	NP_417315.1	16130742	<i>Escherichia coli</i>
<i>lysA</i>	AAA25361.1	149964	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>lysA</i>	BAC92756.1	37196770	<i>Methylophilus methylotrophus</i>
<i>lysA</i>	ABW70801.1	158523325	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>odc1</i>	AA59969.1	386989	<i>Homo sapiens</i>

Cuando 2-amino-4-cetopentanoato presenta estereoquímica L, puede utilizarse una aminoácido descarboxilasa tal como aspartato descarboxilasa (EC 4.1.1.11), ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17) o lisina descarboxilasa (EC 4.1.1.18). Una enzima a modo de ejemplo es aspartato descarboxilasa (EC 4.1.1.11). El 2-amino-4-cetopentanoato porta similitud estructural con aspartato, el sustrato nativo de esta enzima. La aspartato descarboxilasa participa en la biosíntesis de pantotenato y está codificada por *panD* en *Escherichia coli* (Dusch *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1530-1539 (1999); Ramjee *et al.*, *Biochem. J.*, 323:661-669 (1997); Merkel *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 143:247-252 (1996); Schmitzberger *et al.*, *EMBO J.*, 22:6193-6204 (2003)). Las enzimas de *Mycobacterium tuberculosis* (Chopra *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 25:533-540 (2002)) y *Corynebacterium glutanicum* (Dusch *et al.*, citado anteriormente) se han expresado y caracterizado en *E. coli*. Las enzimas lisina descarboxilasas están codificadas en el genoma de *E. coli* por los genes *cadA* y *ldcC*. Se identificó recientemente una lisina descarboxilasa análoga a *CadA* en *Vibrio parahaemolyticus* (Tanaka *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 104:1283-1293 (2008)). La lisina descarboxilasa de *Selenomonas ruminantium*, codificada por *ldc*, porta similitud de secuencia con ornitina descarboxilasas de eucariotas, y acepta tanto L-lisina como L-ornitina como sustratos (Takatsuka *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63:1843-1846 (1999)). Se encuentran candidatos a enzima ornitina descarboxilasa en *Nicotiana glutinosa* (Lee *et al.*,

Biochem. J. 360:657-665 (2001)), *Lactobacillus* sp. 30a (Guirard *et al.*, *J Biol.Chem.* 255:5960-5964 (1980)) y *Vibrio vulnificus* (Lee *et al.*, *J Biol. Chem.* 282:27115-27125 (2007)). Se han dilucidado los residuos implicados en *Vibrio vulnificus* con especificidad de sustrato (Lee *et al.*, citado anteriormente).

- 5 Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 24.

Tabla 24

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>panD</i>	P0A790	67470411	<i>Escherichia coli</i>
<i>panD</i>	Q9X4N0	18203593	<i>Corynebacterium glutanicum</i>
<i>panD</i>	P65660.1	54041701	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>cadA</i>	AAA23536.	145458	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldcC</i>	AAC73297.1	1786384	<i>Escherichia coli</i>
<i>ldc</i>	O50657.1	13124043	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>cadA</i>	AB124819.1	44886078	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>AF323910.1:1..1299</i>	AAG45222.1	12007488	<i>Nicotiana glutinosa</i>
<i>odc1</i>	P43099.2	1169251	<i>Lactobacillus</i> sp. 30a
<i>VV2_1235</i>	NP_763142.1	27367615	<i>Vibrio vulnificus</i>

- 10 En la reacción J (figura 1), se descarboxila acrilato de acetilo para dar 2-oxobuteno por acetoacrilato descarboxilasa. No se ha identificado hasta la fecha una enzima que catalice esta transformación, pero reacciones similares están catalizadas por las enzimas aconitato descarboxilasa, 4-oxalocrotonato descarboxilasa y cinamato descarboxilasa.

- 15 La aconitato descarboxilasa cataliza la etapa final en la biosíntesis de itaconato en una cepa de *Candida* y también en el hongo filamentoso *Aspergillus terreus* (Bonnarme *et al.*, *J. Bacteriol.*, 177:3573-3578 (1995); Willke *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:289-295 (2001)). Una cis-aconitato descarboxilasa (CAD) (EC 4.1.16), codificada por *ATEG_09971*, se ha identificado y estudiado extensamente en *Aspergillus terreus* y otros hongos relacionados. Recientemente, el gen se ha clonado y caracterizado funcionalmente (Kanamasa *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80:223-229 (2008)) y (documento WO/2009/014437).

- 20 Se ha aislado 4-oxalocrotonato descarboxilasa de numerosos organismos y se ha caracterizado. Los genes que codifican para esta enzima incluyen *dmpH* y *dmpE* en *Pseudomonas* sp. (cepa 600) (Shingler *et al.*, *J. Bacteriol.*, 174:711-724 (1992)), *xyIII* y *xyVIII* de *Pseudomonas putida* (Kato *et al.*, *Arch. Microbiol.*, 168:457-463 (1997); Stanley *et al.*, *Biochemistry*, 39:3514 (2000); Lian *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 116:10403-10411 (1994)) y *Reut_B5691* y *Reut_B5692* de *Ralstonia eutropha* JMP134 (Hughes *et al.*, *J. Bacteriol.*, 158:79-83 (1984)). Los genes que codifican para la enzima de *Pseudomonas* sp. (cepa 600) se han clonado y expresado en *E. coli* (Shingler *et al.*, citado anteriormente). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 25.

- 30

Tabla 25

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>dmpH</i>	CAA43228.1	45685	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	45682	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600
<i>xyIII</i>	YP_709328.1	111116444	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>xyVIII</i>	YP_709353.1	111116469	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Reut_B5691</i>	YP_299880.1	73539513	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134
<i>Reut_B5692</i>	YP_299881.1	73539514	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134
<i>ATEG_09971</i>	EAU29420.1	114187720	<i>Aspergillus terreus</i>

- 35 Se ha caracterizado una clase adicional de descarboxilasas que catalizan la conversión de cinamato (fenilacrilato) y derivados de cinamato sustituidos en los derivados de estireno correspondientes. Estas enzimas son comunes en una variedad de organismos y genes específicos que codifican para estas enzimas que se han clonado y expresado en *E. coli* son: *pad1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Clausen *et al.*, *Gene*, 142:107-112 (1994)), *pdc* de *Lactobacillus plantarum* (Barthelmebs *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:1063-1069 (2001); Rodríguez *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 56:3068-3072 (2008); Qi *et al.*, *Biochem. J.*, 375:465-470 (2007)), *pofK* (*pad*) de *Klebsiella oxytoca* (Uchiyama *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72:116-123 (2008); Hashidoko *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58:217-218 (1994)), *Pedicoccus pentosaceus* (Barthelmebs *et al.*, citado anteriormente) y *padC* de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* (Cavin *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1466-1471 (1998)). Una ácido ferúlico descarboxilasa de *Pseudomonas fluorescens* también se ha purificado y caracterizado (Huang *et al.*, *J. Bacteriol.*, 176:5912-5918 (1994)). De manera importante, se ha mostrado que esta clase de enzimas es estable y no requiere cofactores ni exógenos ni unidos internamente, haciendo por tanto que estas enzimas sean adecuadas de manera ideal para biotransformaciones (Sariaslani, F.S., *Annu. Rev. Microbiol.*, 61:51-69 (2007)). Pueden encontrarse datos

- 45

relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 26.

Tabla 26

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>pad1</i>	AAB64980.1	1165293	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>pdC</i>	AAC45282.1	1762616	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>pad</i>	BAF65031.1	149941608	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>padC</i>	NP_391320.1	16080493	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>pad</i>	YP_804027.1	116492292	<i>Pedococcus pentosaceus</i>
<i>pad</i>	CAC18719.1	11691810	<i>Bacillus pumilus</i>

Una enzima adicional para descarboxilación es acetoacetato descarboxilasa (EC 4.1.1.4), una enzima que descarboxila acetoacetato para dar acetona y se ha estudiado por tanto por su papel en la solventogénesis bacteriana. Se han caracterizado enzimas bacterianas a modo de ejemplo de *Clostridium acetobutylicum* (Benner et al., J. Am. Chem. Soc. 103:993-994 (1981); Hlghbarger et al., Biochemistry 35:41-46 (1996); Petersen et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:3491-3498 (1990); Rozzel et al. J. Am. Chem. Soc. 106:4937-4941 (1984)) *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:58-68 (2007)) y *Clostridium beijerinckii* (Ravagnani et al. Mol. Microbiol. 37:1172-1185 (2000)). También se ha demostrado actividad acetoacetato descarboxilasa en *Pseudomonas putida* y *Bacillus polymyxa* pero no se asocian genes con esta actividad hasta la fecha (Matiassek et al., Curr. Microbiol. 42: 276-281 (2001)). Pueden identificarse genes bacterianos en otros organismos tales como *Clostridium botulinum* y *Bacillus amyloliquefaciens* por homología de secuencia. En humanos y otros mamíferos, la acetoacetato descarboxilasa cataliza la etapa final de la ruta de los cuerpos cetónicos (Kalapos, Biochim. Biophys. Acta 1621:122-139 (2003)), pero no se han identificado genes asociados con esta actividad hasta la fecha. Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 27.

Tabla 27

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>adc</i>	NP_149328.1	15004868	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>adc</i>	AAP42566.1	31075386	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>cbei_3835</i>	YP_001310906.1	150018652	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>CLL_A2135</i>	YP_001886324.1	187933144	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>RBAM_030030</i>	YP_001422565.1	154687404	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

Todos los candidatos a gen mencionados anteriormente también pueden usarse para catalizar la descarboxilación de 2-oxo-4-hidroxipentanoato para dar 3-hidroxibutiraldehído en la etapa N de la figura 1.

La butenona hidratasa (etapa G, figura 1), 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa (etapa A, figura 3) y crotonasa (etapa A, figura 3) son transformaciones de tipo hidrolasa. Específicamente, la hidratación de butenona para dar 4-hidroxi-2-butanona (etapa G, figura 1) puede lograrse mediante una enzima en la familia de enzimas hidratatas. Las enzimas que pueden llevar a cabo esta transformación incluyen fumarato hidratasa (EC 4.2.1.2), 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa (EC 4.2.1.-), dimetilmaleato hidratasa (EC 4.2.1.85) y citramalato hidrolasa (EC 4.2.1.34).

Las enzimas fumarato hidratasa catalizan de manera natural la hidratación reversible de fumarato para dar malato. Aunque la capacidad de fumarato hidratasa para reaccionar con butanona como sustrato no se ha descrito en la bibliografía, está disponible abundante información estructural para esta enzima y otros investigadores han modificado satisfactoriamente mediante ingeniería la enzima para alterar su actividad, inhibición y localización (Weaver, T., B. Biol. Crystallogr., 61:1395-1401 (2005)). *E. coli* tiene tres fumarasas: FumA, FumB y FumC que están reguladas por las condiciones de crecimiento. FumB es sensible al oxígeno y sólo es activa en condiciones anaerobias. FumA es activa en condiciones microanaerobias, y FumC es la única enzima activa en crecimiento aerobio (Tseng et al., J. Bacteriol., 183:461-467 (2001); Woods et al., Biochem. Biophys. Acta., 954:14-26 (1988); Guest et al., J. Gen. Microbiol., 131:2971-2984 (1985)). Se encuentran enzimas adicionales en *Campylobacter jejuni* (Smith et al., Int. J. Biochem. Cell Biol., 31:961-975 (1999)), *Thermus thermophilus* (Mizobata et al., Arch. Biochem. Biophys., 355:49-55 (1998)) y *Rattus norvegicus* (Kobayashi et al., J. Biochem., 89:1923-1931 (1981)). Enzimas similares con alta homología de secuencia incluyen *fum1* de *Arabidopsis thaliana* y *fumC* de *Corynebacterium glutamicum*. La fumarasa MmcBC de *Pelotomaculum thermopropionicum* es otra clase de fumarasa con dos subunidades (Shimoyama et al., FEMS Microbiol. Lett., 270:207-213 (2007)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 28.

Tabla 28

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>fumA</i>	NP_416129.1	16129570	<i>Escherichia coli</i>
<i>fumB</i>	NP_418546.1	16131948	<i>Escherichia coli</i>
<i>fumC</i>	NP_416128.1	16129569	<i>Escherichia coli</i>
<i>fumC</i>	O69294	9789756	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>fumC</i>	P84127	75427690	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>fumH</i>	P14408	120605	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>fum1</i>	P93033	39931311	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>fumC</i>	Q8NRN8	39931596	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>MmcB</i>	YP_001211906	147677691	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>
<i>MmcC</i>	YP_001211907	147677692	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>

Dos enzimas hidratatas adicionales son 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa y dimetilmaleato hidratasa, enzimas estudiadas por su papel en el catabolismo de niconitinato en *Eubacterium barkeri* (anteriormente *Clostridium barkeri*) (Alhapel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:12341-12346 (2006)). La 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa es una enzima que contiene [4Fe-4S] que deshidrata 2-(hidroximetil)glutarato para dar 2-metilen-glutarato. Esta enzima está codificada por *hmd* en *Eubacterium barkeri* (Alhapel et al., citado anteriormente). Se encuentran enzimas similares con alta homología de secuencia en *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis* y *Natranaerobius thermophilus*. Estas enzimas son homólogas a las subunidades alfa y beta de serina deshidratatas bacterianas que contienen [4Fe-4S] (por ejemplo, enzimas de *E. coli* codificadas por *tdcG*, *sdhB* y *sdaA*). La dimetilmaleato hidratasa (EC 4.2.1.85) es una enzima reversible sensible al oxígeno y dependiente de Fe^{2+} en la familia de la aconitasa que hidrata dimetilmaleato para formar (2R,3S)-2,3-dimetilmaleato. Esta enzima está codificada por *dmdAB* en *Eubacterium barkeri* (Alhapel, et al., citado anteriormente; Kollmann-Koch et al., Physiol. Chem., 365:847-857 (1984)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 29.

Tabla 29

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>hmd</i>	ABC88407.1	86278275	<i>Eubacterium barkeri</i>
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	154498305	<i>Bacteroides capillosus</i> ATCC 29799
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	167771169	<i>Anaerotruncus colihominis</i> DSM 17241
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	169192667	<i>Natranaerobius thermophilus</i> JW/NM-WN-LF
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	<i>Eubacterium barkeri</i>
<i>dmdB</i>	ABC88409.1	86278277	<i>Eubacterium barkeri</i>

Una enzima adicional es 2-metilmaleato deshidratasa, también denominada citramaleato hidrolasa, una hidrolasa reversible que cataliza la alfa,beta-eliminación de agua de citramaleato para formar mesaconato. Esta enzima se ha purificado y caracterizado en *Clostridium tetanomorphum* (Wang et al., J. Biol. Chem., 244:2516-2526 (1969)). La actividad de esta enzima también se ha detectado en varias bacterias en los géneros *Citrobacter* y *Morganella* en el contexto de la ruta VI de degradación de glutamato (Kato et al., citado anteriormente). No se han identificado genes que codifiquen para esta enzima en ningún organismo hasta la fecha.

La hidratación de crotonil-CoA para formar 3-hidroxi-butilil-CoA (etapa B, figura 3) está catalizada por una crotonasa (EC 4.2.1.55). Estas enzimas se requieren para la formación de n-butanol en algunos organismos, particularmente especies de *Clostridium*, y también comprenden una etapa del ciclo de 3-hidroxi-propionato/4-hidroxi-butilato en arqueas termoacidófilas de los géneros *Sulfolobus*, *Acidilobus* y *Metallosphaera*. Pueden encontrarse genes a modo de ejemplo que codifican para enzimas crotonasas en *C. acetobutylicum* (Boynton et al., J. Bacteriol., 178:3015-3024 (1996)), *C. kluyveri* (Hillmer et al., FEBS Lett., 21:351-354 (1972)) y *Metallosphaera sedula* (Berg et al., citado anteriormente). Enoil-CoA hidratatas, que están implicadas en la beta-oxidación de ácidos grasos y/o el metabolismo de diversos aminoácidos, también pueden catalizar la hidratación de crotonil-CoA para formar 3-hidroxi-butilil-CoA (Roberts et al., Arch. Microbiol., 117:99-108 (1978); Agnihotri et al., Bioorg. Med. Chem., 11:9-20 (2003); Conrad et al., J. Bacteriol., 118:103-111 (1974)). Una enoil-CoA hidratasa a modo de ejemplo es el producto génico de *ech* de *Pseudomonas putida* (Roberts et al., citado anteriormente). Se ha indicado que las enoil-CoA hidratatas, *phaA* y *phaB*, de *P. putida* llevan a cabo la hidroxilación de dobles enlaces durante el catabolismo de fenilacetato (Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6419-6424 (1998)). Los *paaA* y *paaB* de *P. fluorescens* catalizan transformaciones análogas (Olivera et al., citado anteriormente). En último lugar, se ha mostrado que varios genes de *Escherichia coli* demuestran funcionalidad enoil-CoA hidratasa incluyendo *maoC* (Park et al., J. Bacteriol., 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail et al., Eur. J. Biochem., 270:3047-3054 (2003); Park et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 113-116:335-346 (2004); Park et al., Biotechnol Bioeng., 86:681-686 (2004)) y *paaG* (Ismail et al., citado anteriormente; Park et al., citado anteriormente; Park et al., citado anteriormente). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 30.

Tabla 30

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>crt</i>	NP_349318.1	15895969	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>crt1</i>	YP_001393856	153953091	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555
<i>ech</i>	NP_745498.1	26990073	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>phaA</i>	ABF82233.1	26990002	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>phaB</i>	ABF82234.1	26990001	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaA</i>	NP_745427.1	106636093	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>paaB</i>	NP_745426.1	106636094	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>maoC</i>	NP_415905.1	16129348	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaF</i>	NP_415911.1	16129354	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaG</i>	NP_415912.1	16129355	<i>Escherichia coli</i>

Alternativamente, los productos génicos de *E. coli* de *fadA* y *fadB* codifican para un complejo de múltiples enzimas implicado en la oxidación de ácidos grasos que presenta actividad enoil-CoA hidratasa (Haller *et al.*, *Biochemistry* 39:4622-4629 (2000); Martínez-Carrion *et al.*, *J. Biol. Chem.* 240:3538-3546 (1965); Matthies *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1435-1439 (1992)). Puede utilizarse la desactivación de un regulador negativo codificado por *fadR* para activar el producto génico de *fadB* (Jeng *et al.*, *A. Biochemistry* 13:2898-2903 (1974)). Los genes *fadI* y *fadJ* codifican para funciones similares y se expresan de manera natural en condiciones anaerobias (Atsumi *et al.*, *Nature* 451:86-89 (2008)). Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 31.

Tabla 31

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>fadA</i>	YP_026272.1	49176430	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadB</i>	NP_418288.1	16131692	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadI</i>	NP_416844.1	16130275	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadJ</i>	NP_416843.1	16130274	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadR</i>	NP_415705.1	16129150	<i>Escherichia coli</i>

La condensación reversible de 4-hidroxibutiril-CoA para dar crotonil-CoA (etapa A, figura 3) está catalizada por la enzima bifuncional 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa/vinilacetil-CoA Δ -isomerasa. Esta enzima deshidrata en primer lugar 4-hidroxibutiril-CoA para dar vinilacetil-CoA, que se transpone posteriormente para formar crotonoil-CoA. Las enzimas de *Clostridium kluyveri* y *C. aminobutyrium* se han purificado, caracterizado y secuenciado en el dominio N-terminal (Scherf *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 215:421-429 (1993); Scherf *et al.*, *Arch. Microbiol.*, 161:239-245 (1994)). Los genes *abfD* de *C. aminobutyrium* y *C. kluyveri* coinciden exactamente con estas secuencias de aminoácidos N-terminales, y se ha indicado que codifican para las actividades 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa/vinilacetil-CoA Δ -isomerasa. Se identifican genes similares a través de homología de proyectos del genoma, incluyendo *abfD* de *Porphyromonas gingivalis* y *Msed_1220* de *Metallosphaera sedula*. Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 32.

Tabla 32

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>abfD</i>	YP_001396399.1	153955634	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>abfD</i>	P55792	84028213	<i>Clostridium aminobutyricum</i>
<i>abfD</i>	YP_001928843	188994591	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Msed_1220</i>	YP_001191305.1	146303989	<i>Metallosphaera sedula</i>

Puede lograrse la desaminación de 2-amino-4-cetopentanoato (figura 1, reacción I) y de 4-aminobutan-2-ona (etapa F, figura 1) por AKP amoniaco-liasas y 4-aminobutan-2-ona amoniaco-liasas, respectivamente. Estas desaminaciones son muy similares a la desaminación de aspartato para dar fumarato por aspartasa. La enzima se ha estudiado extensamente y están disponibles varias estructuras cristalinas. Se ha mostrado que la enzima de *E. coli* reacciona con sustratos alternativos tales como éster fenilmetílico de aspartato, asparagina, bencil-aspartato y malato (Ma *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 672:60-65 (1992)). En un estudio independiente, se ha implementado evolución dirigida en esta enzima para alterar la especificidad de sustrato (Asano *et al.*, *Biomol. Eng.*, 22:95-101 (2005)). También se han caracterizado enzimas con funcionalidad aspartasa en *Haemophilus influenzae* (Sjostrom *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1324:182-190 (1997)), *Pseudomonas fluorescens* (Takagi *et al.*, *J. Biochem.*, 96:545-552 (1984)), *Bacillus subtilis* (Sjostrom *et al.*, citado anteriormente) y *Serratia marcescens* (Takagi *et al.*, *J. Bacteriol.*, 161:1-6 (1985)).

Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 33.

Tabla 33

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>aspA</i>	NP_418562	90111690	<i>Escherichia coli</i>
<i>aspA</i>	P44324.1	1168534	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>aspA</i>	P07346.1	114273	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>ansB</i>	P26899.1	251757243	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>aspA</i>	P33109.1	416661	<i>Serratia marcescens</i>

Una reacción con amoniaco liasa similar está catalizada por metilaspertasa (EC 4.3.1.2), una enzima que participa en la ruta de fermentación de glutamato mediante mesaconato (Kato *et al.*, citado anteriormente). Esta enzima, también conocida como beta-metilaspertasa y 3-metilaspertato amoniaco-liasa, cataliza de manera natural la desaminación de treo-3-metilaspertato para dar mesaconato. Se ha clonado la 3-metilaspertasa de *Clostridium tetanomorphum*, expresado funcionalmente en *E. coli*, y cristalizado (Asuncion *et al.*, 57:731-733 (2001); Asuncion *et al.*, *J Biol Chem.* 277:8306-8311 (2002); Botting *et al.*, 27:2953-2955 (1988); Goda *et al.*, 31:10747-10756 (1992)). En *Citrobacter amalonaticus*, esta enzima está codificada por BAA28709 (Kato *et al.*, *Arch. Microbiol* 168:457-463 (1997)). También se ha cristalizado la 3-metilaspertasa de *E. coli* YG1002 (Asano *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.* 118:255-258 (1994)) aunque la secuencia de proteína no está enumerada en bases de datos públicas tales como GenBank. Pueden encontrarse datos relacionados con las secuencias para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo usando los siguientes números de registro de GenBank mostrados en la tabla 34.

Tabla 34

Proteína	ID DE GENBANK	NÚMERO DE GI	ORGANISMO
<i>mal</i>	AAB24070.1	259429	<i>Clostridium tetanomorphum</i>
BAA28709	BAA28709.1	3184397	<i>Citrobacter amalonaticus</i>

En algunas realizaciones, la 2-amino-4-cetopentanoato (AKP) tiolasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *ortA* (α), *ortB* (β), *Amet_2368* (α), *Amet_2369* (β), *Tet514_1478* (α), *Tet514_1479* (β), *TTE1235* (α) y *thrC* (β).

En algunas realizaciones, la AKP deshidrogenasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed_1423*, *Msed_0399*, *Msed_0389*, *Msed_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* y *bdh*.

En algunas realizaciones, la 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *aspC*, *AAT2*, *ASP5*, *got2*, *avtA*, *lysN*, *AadAT-II*, *dat*, *lat*, *ygiG*, *spuC*, *SkyPYD4*, *SkUGA1*, *UGA1*, *Abat*, *Abat*, *Gta-1*, *gabT* y *puuE*.

En algunas realizaciones, la 2-amino-4-hidroxipentanoato oxidoreductasa (desaminación) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *gdhA*, *gdh*, *gdhA1*, *rocG*, *gdh1*, *gdh2*, *GDH*, *GDH2*, *ldh* y *nadX*.

En algunas realizaciones, la 2-oxo-4-hidroxipentanoato descarboxilasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *pdC*, *pdC1*, *mdIC*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *cadA*, *ldc*, *ldcC*, *AF323910.1:1...1299*, *odc1*, *VV2_1235*, *dmpH*, *dmpE*, *xyIII*, *xyIII*, *Reut_B5691*, *Reut_B5692*, *CAD*, *pad1*, *poFk* (*pad*), *padC*, *pad*, *adc*, *cbei_3835*, *CLL_A2135*, *RBAM_030030*,

En algunas realizaciones, la 3-hidroxibutiraldehído reductasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdh I*, *bdh II*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsb*, *dhat* y *3hidh*.

En algunas realizaciones, la AKP aminotransferasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *aspC*, *AAT2*, *ASP5*, *got2*, *avtA*, *lysN*, *AadAT-II*, *dat*, *lat*, *ygiG*, *spuC*, *SkyPYD4*, *SkUGA1*, *UGA1*, *Abat*, *Gta-1*, *gabT* y *puuE*.

En algunas realizaciones, la AKP oxidoreductasa (desaminación) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *gdhA*, *gdh*, *gdhA1*, *rocG*, *gdh1*, *gdh2*, *GDH*, *GDH2*, *ldh* y *nadX*. En algunas realizaciones, la 2,4-dioxopentanoato descarboxilasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *pdC*, *pdC1*, *mdIC*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *cadA*, *ldc*, *ldcC*, *AF323910.1:1...1299*, *odc1*, *VV2_1235*, *dmpH*, *dmpE*, *xyIII*, *xyIII*, *Reut_B5691*, *Reut_B5692*, *CAD*, *pad1*, *padC* y *pad*, *adc*, *cbei_3835*, *CLL_A2135*, *RBAM_030030*.

En algunas realizaciones, la 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de cetona) está codificada por uno o más

genes seleccionados del grupo que consiste en *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed_1423*, *Msed_0399*, *Msed_0389*, *Msed_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* y *bdh*.

5 En algunas realizaciones, la 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdh I*, *bdh II*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsb*, *dhat* y *3hidh*.

10 En algunas realizaciones, la 4-hidroxi-2-butanona reductasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed_1423*, *Msed_0399*, *Msed_0389*, *Msed_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* y *bdh*.

15 En algunas realizaciones, la AKP descarboxilasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *pdC*, *pdC1*, *mdlC*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *cadA*, *ldc*, *ldcC*, *AF323910.1:1...1299*, *odc1*, *VV2_1235*, *dmpH*, *dmpE*, *xyIII*, *xyIIII*, *Reut_B5691*, *Reut_B5692*, *CAD*, *pad1*, *pofK(pad)*, *padC*, *pad*.

20 En algunas realizaciones, la 4-aminobutan-2-ona aminotransferasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *aspC*, *AAT2*, *ASP5*, *got2*, *avtA*, *lysN*, *AadAT-II*, *dat*, *lat*, *ygiG*, *spuC*, *SkyPYD4*, *SkUGA1*, *UGA1*, *Abat*, *Gta-1*, *gazT* y *puuE*.

En algunas realizaciones, la 4-aminobutan-2-ona oxidorreductasa (desaminación) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *gdhA*, *gdh*, *gdhA1*, *rocG*, *gdh1*, *gdh2*, *GDH*, *GDH2*, *ldh*, *nadX*, *kdd* y *lysDH*.

25 En algunas realizaciones, la 4-aminobutan-2-ona amoniaco-liasa está codificada por uno o más genes seleccionados de *aspA*, *ansB*, *mal* y *BAA28709*.

30 En algunas realizaciones, la butenona hidratasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fum1*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP_02294*, *ANACOL_02527*, *NtherDRAFT_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *ech*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD*, *Msed_1220*, *fadA*, *fadB*, *fadI*, *fadJ* y *fadR*.

35 En algunas realizaciones, la AKP amoniaco-liasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *aspA*, *ansB*, *mal* y *BAA28709*.

40 En algunas realizaciones, la acrilato de acetilo descarboxilasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *pdC*, *pdC1*, *mdlC*, *dpgB*, *ilvB-1*, *kgd*, *kdcA*, *lysA*, *panD*, *cadA*, *ldc*, *ldcC*, *AF323910.1:1...1299*, *odc1*, *VV2_1235*, *dmpH*, *dmpE*, *xyIII*, *xyIIII*, *Reut_B5691*, *Reut_B5692*, *CAD*, *pad1*, *pofK (pad)*, *padC*, *pad*, *adc*, *cbei_3835*, *CLL_A2135*, *RBAM_030030*.)

45 En algunas realizaciones, la acetoacetil-CoA reductasa (formación de aldehído, dependiente de CoA) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *acr1*, *sucD*, *bphG*, *bld*, *adhE*, *Msed_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci_2370*, *Ald* y *eutE*.

En algunas realizaciones, la acetoacetil-CoA reductasa (formación de alcohol, dependiente de CoA) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *adhE*, *adhE2*, *mcr*, *Rcas_2929*, *NAPI_02720*, *MGP2080_00535* y *FAR*.

50 En algunas realizaciones, la acetoacetil-CoA reductasa (reducción de cetona) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed_1423*, *Msed_0399*, *Msed_0389*, *Msed_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* y *bdh*.

55 En algunas realizaciones, la 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *acr1*, *sucD*, *bphG*, *bld*, *adhE*, *Msed_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci_2370*, *Ald* y *eutE*.

60 En algunas realizaciones, la 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de alcohol) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *adhE*, *adhE2*, *mcr*, *Rcas_2929*, *NAP1_02720*, *MGP2080_00535* y *FAR*.

65 En algunas realizaciones, la 4-hidroxi-butil-CoA deshidratasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fumI*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP_02294*, *ANACOL_02527*, *NtherDRAFT_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crt1*, *ech*, *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD*, *Msed_1220*, *fadA*, *fadB*, *fadI*, *fadJ* y *fadR*.

En algunas realizaciones, la crotonasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste

en *fumA*, *fumB*, *fumC*, *fumH*, *fuml*, *MmcB*, *MmcC*, *hmd*, *BACCAP_02294*, *ANACOL_02527*, *NtherDRAFT_2368*, *dmdA*, *dmdB*, *crt*, *crtl*, *ech* *paaA*, *paaB*, *phaA*, *phaB*, *maoC*, *paaF*, *paaG*, *abfD*, *Msed_1220*, *fadA*, *fadB*, *fadI*, *fadJ* y *fadR*.

Los organismos microbianos que se producen de manera no natural de la invención pueden producirse mediante la introducción de ácidos nucleicos expresables que codifican para una o más de las enzimas o proteínas que participan en una o más rutas de biosíntesis de 1,3-butanodiol, en los que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído). Dependiendo del organismo microbiano huésped elegido para la biosíntesis, pueden expresarse ácidos nucleicos para algunos o todos los de una ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol particular. Por ejemplo, si un huésped elegido es deficiente en una o más enzimas o proteínas para una ruta de biosíntesis deseada, entonces se introducen ácidos nucleicos expresables para la(s) enzima(s) o proteína(s) deficiente(s) en el huésped para la expresión exógena posterior. Alternativamente, si el huésped elegido presenta expresión endógena de algunos genes de la ruta, pero es deficiente en otros, entonces es necesario un ácido nucleico codificante es para la(s) enzima(s) o proteína(s) deficiente(s) para lograr la biosíntesis de 1,3-butanodiol. Por tanto, un organismo microbiano que se produce de manera no natural de la invención puede producirse mediante la introducción de actividades enzimáticas o proteicas exógenas para obtener una ruta de biosíntesis deseada o puede obtenerse una ruta de biosíntesis deseada mediante la introducción de una o más actividades enzimáticas o proteicas exógenas que, junto con una o más enzimas o proteínas endógenas, produce un producto deseado tal como 1,3-butanodiol, en el que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído).

Dependiendo de los constituyentes de la ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol de un organismo microbiano huésped seleccionado, los organismos microbianos que se producen de manera no natural de la invención incluirán, al menos, un ácido nucleico codificante de la ruta de 1,3-butanodiol expresado de manera exógena y hasta todos los ácidos nucleicos codificantes para una o más rutas de biosíntesis de 1,3-butanodiol, en el que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído). Por ejemplo, puede establecerse la biosíntesis de 1,3-butanodiol en un huésped deficiente en una enzima o proteína de la ruta a través de la expresión exógena del ácido nucleico codificante correspondiente. En un huésped deficiente en todas las enzimas o proteínas de una ruta de 1,3-butanodiol, puede incluirse la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en la ruta, aunque se entiende que todas las enzimas o proteínas de una ruta pueden expresarse aunque el huésped contenga al menos una de las enzimas o proteínas de la ruta. Por ejemplo, puede incluirse la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en una ruta para la producción de 1,3-butanodiol.

Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que el número de ácidos nucleicos codificantes a introducir en una forma expresable irá, al menos, en paralelo a las deficiencias de la ruta de 1,3-butanodiol del organismo microbiano huésped seleccionado. Por tanto, un organismo microbiano que se produce de manera no natural de la invención pueden tener uno, dos, tres, cuatro, cinco, hasta todos los ácidos nucleicos que codifican para las enzimas o proteínas que constituyen una ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol divulgadas en el presente documento, en el que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído). En algunas realizaciones, los organismos microbianos que se producen de manera no natural también pueden incluir otras modificaciones genéticas que facilitan u optimizan la biosíntesis de 1,3-butanodiol o que confieren otras funciones útiles al organismo microbiano huésped. Otra funcionalidad de este tipo puede incluir, por ejemplo, aumento de la síntesis de uno o más de los precursores de la ruta de 1,3-butanodiol tales como acetil-CoA.

Generalmente, se selecciona un organismo microbiano huésped de tal manera que produzca el precursor de una ruta de 1,3-butanodiol, o bien como molécula producida de manera natural o bien como producto modificado mediante ingeniería que o bien proporciona la producción *de novo* de un precursor deseado o bien aumenta la producción de un precursor producido de manera natural por el organismo microbiano huésped. Por ejemplo, acetil-CoA se produce de manera natural en un organismo huésped tal como *E. coli*. Un organismo huésped puede modificarse mediante ingeniería para aumentar la producción de un precursor, tal como se divulga en el presente documento. Además, puede usarse un organismo microbiano que se ha modificado mediante ingeniería para producir un precursor deseado como organismo huésped y modificarse adicionalmente mediante ingeniería para expresar enzimas o proteínas de una ruta de 1,3-butanodiol.

En algunas realizaciones, se genera un organismo microbiano que se produce de manera no natural de la invención a partir de un huésped que contiene la capacidad enzimática para sintetizar 1,3-butanodiol. En esta realización específica, puede ser útil aumentar la síntesis o acumulación del producto de una ruta de 1,3-butanodiol para dirigir, por ejemplo, las reacciones de la ruta de 1,3-butanodiol hacia la producción de 1,3-butanodiol. El aumento de la síntesis o acumulación puede lograrse mediante, por ejemplo, la sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifican para una o más de las enzimas o proteínas de la ruta de 1,3-butanodiol descritas anteriormente. La sobreexpresión de la enzima o enzimas y/o proteína o proteínas de la ruta de 1,3-butanodiol puede producirse, por ejemplo, a través de la expresión exógena del gen o genes endógenos, o a través de la expresión exógena del gen o genes heterólogos. Por tanto, pueden generarse fácilmente organismos que se producen de manera natural para que sean

organismos microbianos que se producen de manera no natural de la invención, por ejemplo, produciendo 1,3-butanodiol, a través de la sobreexpresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, es decir, hasta todos los ácidos nucleicos que codifican para enzimas o proteínas de la ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol, en el que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído). Además, puede generarse un organismo que se produce de manera no natural mediante mutagénesis de un gen endógeno que da como resultado un aumento de la actividad de una enzima en la ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol.

En realizaciones particularmente útiles se emplea la expresión exógena de los ácidos nucleicos codificantes. La expresión exógena confiere la capacidad de adaptar a medida la expresión y/o elementos reguladores para el huésped y la aplicación para lograr un nivel de expresión deseado que controla el usuario. Sin embargo, también puede utilizarse expresión endógena en otras realizaciones tal como mediante retirada 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 puede regularse un gen endógeno que tiene un promotor inducible que se produce de manera natural por incremento proporcionando el agente inductor apropiado, o puede modificarse mediante ingeniería la región reguladora de un gen endógeno para incorporar un elemento regulador inducible, permitiendo de ese modo la regulación del aumento de la expresión de un gen endógeno en un momento deseado. De manera similar, puede incluirse un promotor inducible como elemento regulador para un gen exógeno introducido en un organismo microbiano que se produce de manera no natural.

Se entiende que, en métodos de la invención, cualquiera del uno o más ácidos nucleicos exógenos puede introducirse en un organismo microbiano para producir un organismo microbiano que se produce de manera no natural de la invención, en el que se introduce al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído). Los ácidos nucleicos pueden introducirse de modo que confieran, por ejemplo, la ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol al organismo microbiano. Alternativamente, pueden introducirse ácidos nucleicos codificantes para producir un organismo microbiano intermedio que tiene la capacidad de biosíntesis para catalizar algunas de las reacciones requeridas para conferir capacidad de biosíntesis de 1,3-butanodiol. Por ejemplo, un organismo microbiano que se produce de manera no natural que tiene la ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol puede comprender al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican para enzimas o proteínas deseadas. Por tanto, se entiende que puede incluirse cualquier combinación de dos o más enzimas o proteínas de una ruta de biosíntesis en un organismo microbiano que se produce de manera no natural de la invención, en el que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído). De manera similar, se entiende que puede incluirse cualquier combinación de tres o más enzimas o proteínas de una ruta de biosíntesis en un organismo microbiano que se produce de manera no natural de la invención, etcétera, según sea deseado, siempre que la combinación de enzimas y/o proteínas de la ruta de biosíntesis deseada dé como resultado la producción del producto deseado correspondiente, en el que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído). De manera similar, puede incluirse cualquier combinación de cuatro, o más enzimas o proteínas de una ruta de biosíntesis tal como se divulga en el presente documento en un organismo microbiano que se produce de manera no natural de la invención, según se desee, siempre que la combinación de enzimas y/o proteínas de una ruta de biosíntesis deseada dé como resultado la producción del producto deseado correspondiente, en el que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído).

Además de la biosíntesis de 1,3-butanodiol descrita en el presente documento, también puede utilizarse los organismos microbianos que se producen de manera no natural y métodos de la invención en diversas combinaciones entre sí y con otros organismos microbianos y métodos bien conocidos en la técnica para lograr la biosíntesis de productos mediante otras rutas. Por ejemplo, una alternativa para producir 1,3-butanodiol distinta del uso de los productores de 1,3-butanodiol es a través de la adición de otro organismo microbiano capaz de convertir el producto intermedio de la ruta de 1,3-butanodiol en 1,3-butanodiol. Un procedimiento de este tipo incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano que produce el producto intermedio de la ruta para un segundo organismo microbiano que convierte el producto intermedio de la ruta de 1,3-butanodiol en 1,3-butanodiol. El producto intermedio de la ruta de 1,3-butanodiol puede añadirse directamente a otro cultivo del segundo organismo o el cultivo original de los productores del producto intermedio de la ruta de 1,3-butanodiol puede agotarse con respecto a estos organismos microbianos mediante, por ejemplo, separación celular, y luego puede utilizarse la adición posterior del segundo organismo al caldo de fermentación para producir el producto final sin etapas de purificación intermedias.

En otras realizaciones pueden ensamblarse los organismos microbianos que se producen de manera no natural y métodos de la invención en una amplia variedad de subrutas para lograr la biosíntesis de, por ejemplo, 1,3-butanodiol. En estas realizaciones pueden segregarse las rutas de biosíntesis para un producto deseado en diferentes organismos microbianos, y los diferentes organismos microbianos pueden cocultivarse para producir el producto final. En un esquema de biosíntesis de este tipo el producto de un organismo microbiano es el sustrato para un segundo organismo microbiano hasta que se sintetiza el producto final. Por ejemplo, la biosíntesis de 1,3-butanodiol puede lograrse mediante la construcción de un organismo microbiano que contiene rutas de biosíntesis para la conversión de un producto intermedio de la ruta en otro producto intermedio de la ruta o el producto.

Alternativamente también puede producirse 1,3-butanodiol de manera biosintética a partir de organismos microbianos a través de cocultivo o cofermentación usando dos organismos en el mismo recipiente, en el que el primer organismo microbiano produce un producto intermedio de 1,3-butanodiol y el segundo organismo microbiano convierte el producto intermedio en 1,3-butanodiol.

Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento los expertos en la técnica entenderán que existen una amplia variedad de combinaciones y permutaciones para los organismos microbianos que se producen de manera no natural y métodos de la invención junto con otros organismos microbianos, con el cocultivo de otros organismos microbianos que se producen de manera no natural que tienen subrutas y con combinaciones de otros procedimientos químicos y/o bioquímicos bien conocidos en la técnica para producir 1,3-butanodiol.

Las fuentes de ácidos nucleicos codificantes para la enzima o proteína de la ruta de 1,3-butanodiol pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie en la que el producto génico codificado sea capaz de catalizar la reacción referenciada. Tales especies incluyen organismos tanto procariotas incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias, incluyendo arqueas y eubacterias, y eucariotas, incluyendo levaduras, plantas, insectos, animales y mamíferos, incluyendo humanos. Especies a modo de ejemplo para tales fuentes incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*, así como otras especies a modo de ejemplo divulgadas en el presente documento o disponibles como organismos fuente para genes correspondientes. Sin embargo, con la secuencia del genoma completo disponible en la actualidad para más de 550 especies (con más de la mitad de estas disponibles en bases de datos públicas tales como la de NCBI), incluyendo 395 genomas de microorganismos y una variedad de genomas de levaduras, hongos, plantas y mamíferos, la identificación de genes que codifican para la actividad de biosíntesis de 1,3-butanodiol requerida 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 las alteraciones genéticas entre organismos es rutinario y bien conocido en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de 1,3-butanodiol descritas en el presente documento con referencia a un organismo particular tal como *E. coli* pueden aplicarse inmediatamente a otros microorganismos, incluyendo organismos tanto procariotas como eucariotas. Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica ejemplificada en un organismo puede aplicarse igualmente a otros organismos.

En algunos casos, tales como cuando existe una ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol alternativa en una especie no relacionada, puede conferirse la biosíntesis de 1,3-butanodiol a la especie huésped mediante, por ejemplo, la expresión exógena de un parálogo o parálogos de la especie no relacionada que cataliza una reacción metabólica similar, aunque no idéntica, para sustituir la reacción referenciada. Debido a que existen determinadas diferencias entre redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la técnica entenderán que el uso de gen real entre diferentes organismos puede diferir. Sin embargo, dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica también entenderán que las enseñanzas y los métodos de la invención pueden aplicarse a todos los organismos microbianos usando las alteraciones metabólicas relacionadas con respecto a las ejemplificadas en el presente documento para construir un organismo microbiano en una especie de interés que sintetizará 1,3-butanodiol.

Los organismos microbianos huésped pueden seleccionarse de, y los organismos microbianos que se producen de manera no natural generarse en, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a procesos de fermentación. Las bacterias a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *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*. Las levaduras u hongos a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Pichia pastoris*. *E. coli* es un organismo huésped particularmente útil puesto que es un organismo microbiano bien caracterizado adecuado para modificación mediante ingeniería genética. Otros organismos huésped particularmente útiles incluyen levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*.

Pueden realizarse métodos para construir y someter a prueba los niveles de expresión de un huésped productor de 1,3-butanodiol que se produce de manera no natural, por ejemplo, mediante métodos recombinantes y de detección bien conocidos en la técnica. Tales métodos pueden encontrarse descritos en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

Pueden introducirse secuencias de ácido nucleico exógeno implicadas en una ruta para la producción de 1,3-butanodiol de manera estable o transitoria en una célula huésped usando técnicas bien conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, conjugación, electroporación, transformación química, transducción, transfección y transformación por ultrasonidos. Para la expresión exógena en *E. coli* u otras células procariotas, algunas secuencias de ácido nucleico en los genes o ADNc de ácidos nucleicos eucariotas pueden codificar para señales de direccionamiento tales como una señal mitocondrial N-terminal u otra señal de direccionamiento, que puede retirarse

antes de la transformación en células huésped procariotas, si se desea. Por ejemplo, la retirada de una secuencia líder mitocondrial condujo al aumento de la expresión en *E. coli* (Hoffmeister *et al.*, J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Para la expresión exógena en levaduras u otras células eucariotas, pueden expresarse genes en el citosol sin la adición de la secuencia líder, o pueden direccionarse a la mitocondria u otros orgánulos, o direccionarse para secreción, mediante la adición de una secuencia de direccionamiento adecuada tal como una señal de sección o de direccionamiento mitocondrial adecuada para las células huésped. Por tanto, se entiende que pueden incorporarse modificaciones apropiadas a una secuencia de ácido nucleico para retirar o incluir una secuencia de direccionamiento, en una secuencia de ácido nucleico exógeno para conferir las propiedades deseables. Además, pueden someterse a optimización genes de codones con técnicas bien conocidas en la técnica para lograr la expresión optimizada de las proteínas.

Un vector o vectores de expresión pueden construirse para incluir uno o más ácidos nucleicos codificantes de la ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol, tal como se ejemplifica en el presente documento operativamente unidos a secuencias funcionales de control de la expresión en el organismo huésped. Los vectores de expresión aplicables para su uso en los organismos microbianos huéspedes de la invención incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores de fago, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, incluyendo vectores y secuencias de selección o marcadores operables para la integración estable en un cromosoma del huésped. Adicionalmente, los vectores de expresión pueden incluir uno o más genes marcadores seleccionables y secuencias de control de la expresión apropiadas. También pueden incluirse genes marcadores seleccionables que, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, complementan deficiencias auxótrofas, o no suministran nutrientes críticos en los medios de cultivo. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, y similares que se conocen bien en la técnica. Cuando van a coexpresarse dos o más ácidos nucleicos codificantes exógenos, ambos ácidos nucleicos pueden insertarse, por ejemplo, en un único vector de expresión o en vectores de expresión independientes. Para la expresión con un único vector, los ácidos nucleicos codificantes pueden unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión común o unirse a diferentes secuencias de control de la expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ácido nucleico exógeno implicadas en una ruta de síntesis o metabólica puede confirmarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, análisis de ácidos nucleicos tal como transferencias de tipo Northern o amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ARNm, o inmunotransferencia para la expresión de productos génicos, u otros métodos analíticos adecuados para someter a prueba la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida o su producto génico correspondiente. Los expertos en la técnica entienden que el ácido nucleico exógeno se expresa en una cantidad suficiente para producir el producto deseado, y entienden además que los niveles de expresión pueden optimizarse para obtener una expresión suficiente usando métodos bien conocidos en la técnica y tal como se divulga en el presente documento.

La invención proporciona un método para producir 1,3-BDO que incluye cultivar el organismo microbiano que se produce de manera no natural divulgado en el presente documento, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir 1,3-BDO, incluyendo organismos que incorporan uno, dos, tres, cuatro, cinco, hasta todos los ácidos nucleicos exógenos que codifican para enzimas que completan una ruta de 1,3-BDO, en el que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído). Las rutas de 1,3-BDO incluyen un conjunto de enzimas de la ruta de 1,3-BDO, en el que el conjunto de enzimas de la ruta de 1,3-BDO se identifican como antes, concretamente: (a) (1) una 2-amino-4-cetopentanoato (AKP) tiolasa; (2) una AKP deshidrogenasa; (3) una 2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa u oxidorreductasa (desaminación); (4) una 2-oxo-4-hidroxipentanoato descarboxilasa; y (5) una 3-hidroxi-butilaldehído reductasa; (b) (1) una 2-amino-4-cetopentanoato (AKP) tiolasa; (2) una AKP aminotransferasa u oxidorreductasa (desaminación); (3) una 2,4-dioxopentanoato descarboxilasa; (4) una 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de cetona); y (5) una 3-hidroxi-butilaldehído reductasa; (c) (1) una 2-amino-4-cetopentanoato (AKP) tiolasa; (2) una AKP aminotransferasa u oxidorreductasa (desaminación); (3) una 2,4-dioxopentanoato descarboxilasa; y (4) una 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído); y (5) una 4-hidroxi-2-butanona reductasa; (d) (1) una 2-amino-4-cetopentanoato (AKP) tiolasa; (2) una AKP descarboxilasa; (3) una 4-aminobutan-2-ona aminotransferasa u oxidorreductasa (desaminación); (4) una 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de cetona); y (5) una 3-hidroxi-butilaldehído reductasa; (e) (1) una 2-amino-4-cetopentanoato (AKP) tiolasa; (2) una AKP descarboxilasa; (3) una 4-aminobutan-2-ona aminotransferasa u oxidorreductasa (desaminación); (4) una 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído); y (5) una 4-hidroxi-2-butanona reductasa; (f) (1) una 2-amino-4-cetopentanoato (AKP) tiolasa; (2) una AKP descarboxilasa; (3) una 4-aminobutan-2-ona amoniaco-liasa; (4) una butanona hidratasa; y (5) una 4-hidroxi-2-butanona reductasa; (g) (1) una 2-amino-4-cetopentanoato (AKP) tiolasa; (2) una AKP amoniaco-liasa; (3) una acrilato de acetilo descarboxilasa; (4) una butanona hidratasa; y (5) una 4-hidroxi-2-butanona reductasa; (h) (1) una acetoacetil-CoA reductasa (formación de aldehído, dependiente de CoA); (2) una 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de cetona); y (3) una 3-hidroxi-butilaldehído reductasa; (i) (1) una acetoacetil-CoA reductasa (CoA dependiente, formación de alcohol) y (2) una 4-hidroxi-2-butanona reductasa; (j) (1) una acetoacetil-CoA reductasa (formación de aldehído, dependiente de CoA); (2) una 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído); y (3) una 4-hidroxi-2-butanona reductasa; (k) (1) una acetoacetil-CoA reductasa (reducción de cetona) y (2) una 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de alcohol); (1) (1) una acetoacetil-CoA reductasa (reducción de cetona); (2) una 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de aldehído); y (3) una 3-hidroxi-butilaldehído reductasa; (m) (1) una 4-hidroxi-butil-CoA deshidratasa; (2) una crotonasa; y (3) una 3-

hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol); y (n) (1) una 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa; (2) una crotonasa; (3) una 3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído); y (4) una 3-hidroxibutiraldehído reductasa.

Pueden realizarse una purificación adecuada y/o ensayos para someter a prueba la producción de 1,3-butanodiol usando métodos bien conocidos. Pueden hacerse crecer réplicas adecuadas tales como cultivos por triplicado para cada cepa modificada mediante ingeniería que va a someterse a prueba. Por ejemplo, puede monitorizarse la formación de productos y subproductos en el huésped de producción modificado mediante ingeniería. El producto final y los productos intermedios, y otros compuestos orgánicos, pueden analizarse mediante métodos tales como HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución), CG-EM (cromatografía de gases-espectroscopía de masas) y CL-EM (cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas) u otros métodos analíticos adecuados usando procedimientos rutinarios bien conocidos en la técnica. La liberación de producto en el caldo de fermentación también puede someterse a prueba con el sobrenadante de cultivo. Pueden cuantificarse los subproductos y la glucosa residual mediante HPLC usando, por ejemplo, un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector UV para ácidos orgánicos (Lin *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779 (2005)), u otros métodos de ensayo y detección adecuados bien conocidos en la técnica. Las actividades enzimáticas o proteicas individuales de las secuencias de ADN exógeno también pueden someterse a ensayo usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO/2008/115840 y Hanai *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7814-7818 (2007)).

El 1,3-butanodiol puede separarse de otros componentes en el cultivo usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos de separación incluyen, por ejemplo, procedimientos de extracción así como métodos que incluyen extracción líquido-líquido continua, pervaporación, filtración con membrana, separación con membrana, ósmosis inversa, electrodíalisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de adsorción y ultrafiltración. Todos los métodos anteriores se conocen bien en la técnica.

Cualquiera de los organismos microbianos que se producen de manera no natural descritos en el presente documento puede cultivarse para producir y/o secretar el producto biosintético. Por ejemplo, los productores de 1,3-butanodiol pueden cultivarse para la producción por biosíntesis de 1,3-butanodiol.

Para la producción de 1,3-butanodiol, se cultivan las cepas recombinantes en un medio con fuente de carbono y otros nutrientes esenciales. Es altamente deseable mantener condiciones anaerobias en el fermentador para reducir el coste global del procedimiento. Tales condiciones pueden obtenerse, por ejemplo, burbujeando en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellando los matraces con un septo y tapa roscada. Para cepas en las que no se observa crecimiento de manera anaerobia pueden aplicarse condiciones microaerobias mediante la perforación del septo con un pequeño orificio para su aireación limitada. Se han descrito a modo de ejemplo condiciones anaerobias previamente y se conocen bien en la técnica. Se describen condiciones aerobias y anaerobias a modo de ejemplo, por ejemplo, en la publicación estadounidense nº US-2009-0047719, presentada el 10 de agosto de 2007. Pueden realizarse fermentaciones de manera discontinua, semicontinua o continua, tal como se divulga en el presente documento.

Si se desea, el pH del medio puede mantenerse a un pH deseado, en particular pH neutro, tal como un pH de aproximadamente 7 mediante la adición de una base, tal como NaOH u otras bases, o ácido, según sea necesario para mantener el medio de cultivo a un pH deseable. Puede determinarse la velocidad de crecimiento midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm) y la velocidad de captación de glucosa monitorizando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo. Además de materias primas renovables tales como las ejemplificadas anteriormente, los organismos microbianos de 1,3-butanodiol de la invención también pueden modificarse para su crecimiento con gas de síntesis como su fuente de carbono. En esta realización específica, una o más proteínas o enzimas se expresan en los organismos productores de 1,3-butanodiol para proporcionar una ruta metabólica para la utilización de gas de síntesis u otra fuente de carbono gaseosa.

Los organismos de la presente invención pueden utilizar, por ejemplo, cualquier fuente de hidratos de carbono que pueda suministrar una fuente de carbono al microorganismo que se produce de manera no natural. Tales fuentes incluyen, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Otras fuentes de carbohidrato incluyen, por ejemplo, materias primas renovables y biomasa. Los tipos de biomasa a modo de ejemplo que pueden usarse como materias primas en los métodos de la invención incluyen biomasa celulósica, biomasa hemicelulósica y materias primas de lignina o partes de materias primas. Tales materias primas de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de hidratos de carbono útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que también pueden usarse materias primas renovables y biomasa distintas de las ejemplificadas anteriormente para cultivar los organismos microbianos de la invención para la producción de 1,3-butanodiol.

Por consiguiente, dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que puede producirse un organismo microbiano que se produce de manera no natural que secreta los compuestos biosintetizados cuando se hacen crecer con una fuente de carbono tal como gas de síntesis, CO y/o CO₂. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, 1,3-butanodiol y cualquiera de los metabolitos intermedios en

la ruta de 1,3-butanodiol. Todo lo que se requiere es modificar mediante ingeniería en una o más de las actividades enzimáticas o proteicas requeridas para lograr la biosíntesis del compuesto o producto intermedio deseado incluyendo, por ejemplo, la inclusión de algunas o todas las rutas de biosíntesis de 1,3-butanodiol. Por consiguiente, la invención proporciona un organismo microbiano que no se produce de manera natural que produce y/o secreta 1,3-butanodiol cuando se hace crecer con una fuente de hidratos de carbono u otra fuente de carbono y produce y/o secreta cualquiera de los metabolitos intermedios mostrados en la ruta de 1,3-butanodiol cuando se hace crecer en una fuente de hidratos de carbono u otra fuente de carbono.. Los organismos microbianos productores de 1,3-butanodiol de la invención pueden iniciar la síntesis de un producto intermedio, por ejemplo, acetil-CoA.

Los organismos microbianos que se producen de manera no natural de la invención se construyen usando métodos bien conocidos en la técnica tal como se ejemplifica en el presente documento para expresar de manera exógena al menos un ácido nucleico que codifica para una enzima o proteína de la ruta de 1,3-butanodiol en cantidades suficientes como para producir 1,3-butanodiol, en el que el organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxi butiril-CoA reductasa (formación de aldehído). Se entiende que los organismos microbianos de la invención se cultivan en condiciones suficientes como para producir 1,3-butanodiol. Siguiendo las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los organismos microbianos que se producen de manera no natural de la invención pueden lograr la biosíntesis de 1,3-butanodiol dando como resultado concentraciones intracelulares de entre aproximadamente 0,1-2000 mM o más. Generalmente, la concentración intracelular de 1,3-butanodiol está entre aproximadamente 3-1800 mM, particularmente entre aproximadamente 5-1700 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-1600 mM, incluyendo aproximadamente 100 mM, 200 mM, 500 mM, 800 mM, o más. Las concentraciones intracelulares entre y por encima de cada uno de estos intervalos a modo de ejemplo también pueden lograrse a partir de los organismos microbianos que se producen de manera no natural de la invención.

En algunas realizaciones las condiciones de cultivo incluyen condiciones de crecimiento o mantenimiento anaerobias o sustancialmente anaerobias. Se han descrito condiciones anaerobias a modo de ejemplo previamente y se conocen bien en la técnica. Se describen condiciones anaerobias a modo de ejemplo para procesos de fermentación en el presente documento y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense nº US 2009/0047719, presentada el 10 de agosto de 2007. Pueden emplearse cualquiera de estas condiciones con los organismos microbianos que se producen de manera no natural así como otras condiciones anaerobias bien conocidas en la técnica. En tales condiciones anaerobias los productores de 1,3-butanodiol pueden sintetizar 1,3-butanodiol a concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más así como todas las demás concentraciones ejemplificadas en el presente documento. Se entiende que, aunque la descripción anterior se refiere a concentraciones intracelulares, los organismos microbianos productores de 1,3-butanodiol pueden producir 1,3-butanodiol de manera intracelular y/o secretar el producto en el medio de cultivo.

Las condiciones de cultivo pueden incluir, por ejemplo, procedimientos de cultivo líquido así como fermentación y otros procedimientos de cultivo a gran escala. Tal como se describe en el presente documento, pueden obtenerse rendimientos particularmente útiles de los productos biosintéticos en condiciones de cultivo anaerobias o sustancialmente anaerobias.

Tal como se describe en el presente documento unas condiciones de crecimiento a modo de ejemplo para lograr la biosíntesis de 1,3-butanodiol incluyen condiciones de fermentación o cultivo anaerobias. En determinadas realizaciones los organismos microbianos que se producen de manera no natural de la invención pueden sostenerse, cultivarse o fermentarse en condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias. En resumen, condiciones anaerobias se refieren a un entorno carente de oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaerobias incluyen, por ejemplo, un cultivo, una fermentación discontinua o fermentación continua tal que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanece entre el 0 y el 10% de saturación. Las condiciones sustancialmente anaerobias también incluyen el crecimiento o reposo de células en medio líquido o sobre agar sólido en el interior de una cámara sellada mantenida con una atmósfera de menos del 1% de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede mantenerse burbujeando, por ejemplo, el cultivo con una mezcla de N_2/CO_2 u otro gas o gases distintos de oxígeno adecuados.

Las condiciones de cultivo descritas en el presente documento pueden aumentarse a escala y hacerse crecer de manera continua para la fabricación de 1,3-butanodiol. Los procedimientos de crecimiento a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, fermentación semicontinua y separación discontinua; fermentación semicontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procedimientos se conocen bien en la técnica. Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción por biosíntesis de cantidades comerciales de 1,3-butanodiol. Generalmente, y como con los procedimientos de cultivo no continuos, la producción continua y/o casi continua de 1,3-butanodiol incluirá cultivar un organismo productor de 1,3-butanodiol que se produce de manera no natural de la invención en nutrientes y medio suficientes como para sostener y/o casi sostener el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo en tales condiciones puede incluir, por ejemplo, 1 día, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días o más. Adicionalmente, el cultivo continuo puede incluir 1 semana, 2, 3, 4 ó 5 semanas o más y hasta varios meses. Alternativamente, pueden cultivarse organismos de la invención durante horas, si es adecuado para una aplicación particular. Ha de entenderse que las condiciones de cultivo continuas y/o casi continuas también pueden incluir todos los intervalos de tiempo entremedias de estos periodos a modo de ejemplo.

Se entiende además que el tiempo de cultivo del organismo microbiano de la invención es durante un periodo de tiempo suficiente como para producir una cantidad suficiente de producto para un fin deseado.

Se conocen bien en la técnica procedimientos de fermentación. En resumen, la fermentación para la producción por biosíntesis de 1,3-butanodiol puede utilizarse, por ejemplo, en fermentación semicontinua y separación discontinua; fermentación semicontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Se conocen bien en la técnica ejemplos de procedimientos de fermentación discontinuos y continuos.

Además de los procedimientos de fermentación anteriores usando los productores de 1,3-butanodiol de la invención para la producción continua de cantidades sustanciales de 1,3-butanodiol, los productores de 1,3-butanodiol también pueden someterse, por ejemplo, simultáneamente a procedimientos de síntesis química para convertir el producto en otros compuestos o el producto puede separarse del cultivo de fermentación y someterse posteriormente a conversión química para convertir el producto en otros compuestos, si se desea.

En algunas realizaciones puede usarse gas de síntesis como materia prima de carbono. Son consideraciones de importancia de procedimiento para una fermentación con gas de síntesis la alta concentración de biomasa y buena transferencia másica gas-líquido (Bredwell *et al.*, *Biotechnol Prog.*, 15:834-844 (1999). La solubilidad de CO en agua es algo menor que la de oxígeno. Pueden realizarse fermentaciones con burbujeo de gas de manera continua en fermentadores controlados con análisis de gas de escape constante mediante espectrometría de masas y toma periódica de muestras de líquido y análisis mediante CG y HPLC. La fase líquida puede funcionar en modo discontinuo. Se cuantifican los productos de fermentación tales como alcoholes, ácidos orgánicos y glucosa residual junto con metanol residual mediante HPLC (Shimadzu, Columbia MD), por ejemplo, usando una serie Aminex® de columnas de HPLC (por ejemplo, serie HPX-87) (BioRad, Hercules CA), usando un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector UV para ácidos orgánicos. Se determina la velocidad de crecimiento midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm). Todos los tubos en estos sistemas son de vidrio o metal para mantener condiciones anaerobias. Se realiza el burbujeo de gas con fritas de vidrio para disminuir el tamaño de burbuja y mejorar la transferencia másica. Se someten a prueba diversas velocidades de burbujeo, que oscilan entre aproximadamente 0,1 y 1 vvm (volúmenes de vapor por minuto). Para obtener mediciones precisas de velocidades de captación de gas se realizan exposiciones periódicas en las que se detiene temporalmente el flujo de gas y se monitoriza la composición de la fase gaseosa en función del tiempo.

Para lograr la productividad objetivo global se emplean métodos de recirculación o retención celular. Un método para aumentar la concentración microbiana es recircular células mediante una membrana de flujo tangencial de una corriente lateral. También puede usarse cultivo discontinuo repetido tal como se describió previamente para la producción de acetato por *Moorella* (Sakai *et al.*, *J Biosci. Bioeng.*, 99:252-258 (2005)). También pueden usarse otros métodos diversos (Bredwell *et al.*, *Biotechnol Prog.*, 15:834-844 (1999); Datar *et al.*, *Biotechnol Bioeng.*, 86:587-594 (2004)). Puede someterse a prueba la optimización adicional tal como sobrepresión a 1,5 atm para mejorar la transferencia másica (Najafpour *et al.*, *Enzyme and Microbial Technology*, 38[1-2], 223-228 (2006)).

Una vez que se logra un rendimiento satisfactorio usando H₂/CO puro como alimentación, se generan mezclas de gas de síntesis que contienen inhibidores que es probable que estén presentes en gas de síntesis comercial. Por ejemplo, un perfil de impurezas típico es el 4,5% de CH₄, el 0,1% de C₂H₂, el 0,35% de C₂H₆, el 1,4% de C₂H₄, y 150 ppm de óxido nítrico (Datar *et al.*, *Biotechnol Bioeng.*, 86:587-594 (2004)). Se añaden alquitranes, representados por compuestos tales como benceno, tolueno, etilbenceno, p-xileno, o-xileno y naftaleno, a niveles de ppm para someter a prueba cualquier efecto sobre la producción. Por ejemplo, se ha mostrado que 40 ppm de NO es inhibidor para *C. carboxidivorans* (Ahmed *et al.*, *Biotechnol Bioeng.*, 97:1080-1086 (2007)). Se someten a prueba cultivos en matraces de agitación antes de pasarse a un fermentador. Además, se someten a prueba diferentes niveles de estos posibles compuestos inhibidores para cuantificar el efecto que tienen sobre el crecimiento celular. Este conocimiento se usa para desarrollar especificaciones para la pureza del gas de síntesis, que se utilizan para estudios y la producción con aumento de escala. Si se encuentra que cualquier componente particular es difícil de disminuir o retirar del gas de síntesis usado para la ampliación a escala, se utiliza un procedimiento de evolución adaptativa para adaptar células para que toleren una o más impurezas.

Los avances en el campo de la modificación mediante ingeniería de proteínas hacen que sea factible alterar cualquiera de las enzimas divulgadas en el presente documento para que actúen eficazmente sobre sustratos que se sabe que no son naturales para las mismas. A continuación hay varios ejemplos de enzimas de amplia especificidad de diversas clases de interés y métodos que se han usado para hacer evolucionar tales enzimas para que actúen sobre sustratos no naturales.

Una clase de enzimas en las rutas divulgadas en el presente documento son las oxidorreductasas que interconvierten cetonas o aldehídos en alcoholes (1.1.1). Las enzimas en esta clase pueden operar sobre una amplia gama de sustratos. Se mostró que una alcohol deshidrogenasa (1.1.1.1) purificada de la bacteria del suelo *Brevibacterium* sp KU 1309 (Hirano *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 100:318-322 (2005)) opera sobre una pluralidad de alcoholes alifáticos así como aromáticos con altas actividades. La tabla 33 muestra la actividad de la enzima y su K_m con diferentes alcoholes. La enzima es reversible y tiene actividad muy alta sobre varios aldehídos también tal como se muestra en la tabla 34.

Tabla 33

SUSTRATO	ACTIVIDAD RELATIVA (%)	K _M (MM)
2-Feniletanol	100	0,025
(S)-2-Fenilpropanol	156	0,157
(R)-2-Fenilpropanol	63	0,020
Alcohol bencílico	199	0,012
3-Fenilpropanol	135	0,033
Etanol	76	
1-Butanol	111	
1-Octanol	101	
1-Dodecanol	68	
1-Feniletanol	46	
2-Propanol	54	

5 En esta tabla, se tomó la actividad de 2-feniletanol, correspondiente a 19,2 U/mg, como el 100%.

Tabla 34

SUSTRATO	ACTIVIDAD RELATIVA (%)	K _M (MM)
Fenilacetaldehído	100	0,261
2-Fenilpropionaldehído	188	0,864
1-Octilaldehído	87	
Acetofenona	0	

10 La lactato deshidrogenasa (1.1.1.27) de *Ralstonia eutropha* es otra enzima que se ha demostrado que tiene altas actividades sobre varios 2-oxoácidos tales como 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (un compuesto C5 análogo a 2-oxoadipato) (Steinbuechel *et al.*, citado anteriormente). La columna 2 de la tabla 35 demuestra las actividades de *ldhA* de *R. eutropha* (anteriormente *A. eutrophus*) sobre diferentes sustratos (Steinbuechel *et al.*, citado anteriormente).

15

Tabla 35

Sustrato	Actividad de L(+)-lactato deshidrogenasa de <i>A. eutrophus</i>	Actividad de L(+)-lactato deshidrogenasa de músculo de conejo	Actividad de D(-)-lactato deshidrogenasa de <i>L. leishmanii</i>
	%		
Glioxilato	8,7	23,9	5,0
Piruvato	100,0	100,0	100,0
2-Oxobutirato	107,0	18,6	1,1
2-Oxovalerato	125,0	0,7	0,0
3-Metil-2-oxobutirato	28,5	0,0	0,0
3-Metil-2-oxovalerato	5,3	0,0	0,0
4-Metil-2-oxopentanoato	39,0	1,4	1,1
Oxaloacetato	0,0	33,1	23,1
2-Oxoglutarato	79,6	0,0	0,0
3-Fluoropiruvato	33,6	74,3	40,0

20 Se ha mostrado que las oxidoreductasas que pueden convertir 2-oxoácidos en sus homólogos de acil-CoA (1.2.1) aceptan también múltiples sustratos. Por ejemplo, el complejo de 2-ceto-ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKAD), también conocido como 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (1.2.1.25), participa en rutas de degradación de aminoácidos de cadena ramificada, que convierten derivados de 2-cetoácidos de valina, leucina e isoleucina en sus derivados de acil-CoA y CO₂. En algunos organismos incluyendo *Rattus norvegicus* (Paxton *et al.*, *Biochem. J.* 234:295-303 (1986)) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sinclair *et al.*, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31:911-922 (1993)), se ha

25 mostrado que este complejo tiene una amplia variedad de sustrato que incluye oxo-ácidos lineales tales como 2-oxobutanoato y alfa-cetoglutarato, además de los precursores de aminoácidos de cadena ramificada.

Se ha notificado que los miembros de aún otra clase de enzimas, concretamente aminotransferasas (2.6.1), actúan sobre múltiples sustratos. Se ha identificado la aspartato aminotransferasa (aspAT) de *Pyrococcus fursious*, expresada en *E. coli* y se ha caracterizado la proteína recombinante para demostrar que la enzima tiene las mayores actividades hacia aspartato y alfa-cetoglutarato pero actividades menores, aunque significativas hacia alanina, glutamato y los aminoácidos aromáticos (Ward *et al.*, *Archea*. 1:133-141 (2002)). En otro caso, se notificó que una aminotransferasa identificada a partir de *Leishmania mexicana* y expresada en *E. coli* (Vernal *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 229:217-222 (2003)) que tiene una amplia especificidad de sustrato hacia tirosina (actividad considerada el 100% sobre tirosina), fenilalanina (90%), triptófano (85%), aspartato (30%), leucina (25%) y metionina (25%) respectivamente (Vernal *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 96:83-92 (1998)). Se ha notificado una amplia especificidad similar para una tirosina aminotransferasa de *Trypanosoma cruzi*, aunque ambas de estas enzimas tienen una homología de secuencia de sólo el 6%. Obsérvese que esta última enzima puede aceptar leucina, metionina así como tirosina, fenilalanina, triptófano y alanina como donadores de amino eficaces (Nowicki *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1546: 268-281 (2001)).

En contraposición a estos ejemplos en los que las enzimas tienen de manera natural amplias especificidades de sustrato, se han modificado numerosas enzimas usando evolución dirigida para ampliar su especificidad hacia sus sustratos no naturales. Alternativamente, también se ha cambiado la preferencia de sustrato de una enzima usando evolución dirigida. Por ejemplo, se ha notificado que se mejoró significativamente la enantioselectividad de una lipasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta enzima hidrolizó 2-metildecanoato de p-nitrofenilo con sólo el 2% de exceso enantiomérico (e.e.) a favor del (S)-ácido. Sin embargo, tras cuatro tandas sucesivas de mutagénesis propensa a error y selección, se produjo una variante que catalizaba la reacción requerida con el 81% de e.e. (Reetz *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 36:2830-2832 (1997)).

Los métodos de evolución dirigida han hecho posible la modificación de una enzima para que funcione sobre una serie de sustratos no naturales. La especificidad de sustrato de la lipasa en *P. aeruginosa* se amplió mediante aleatorización de residuos de aminoácido cerca del sitio activo. Esto estuvo seguido por la aceptación de ésteres de ácidos carboxílicos alfa-sustituidos por esta enzima (Reetz *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44:4192-4196 (2005)). En otro intento satisfactorio se empleó intercambio de ADN para crear una aminotransferasa de *Escherichia coli* que aceptaba sustratos β -ramificados, que se aceptaban escasamente por la enzima de tipo natural (Yano *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:5511-5515 (1998)). Específicamente, al final de cuatro tandas de intercambio, la actividad de aspartato aminotransferasa para valina y 2-oxovalina aumentó en hasta cinco órdenes de magnitud, mientras que disminuyó la actividad hacia el sustrato natural, aspartato, en hasta 30 veces. Recientemente, se usó un algoritmo para diseñar una retro-aldolasa que pudo usarse para catalizar la escisión de enlaces carbono-carbono en un sustrato no natural y no biológico, 4-hidroxi-4-(6-metoxi-2-naftil)-2-butanona. Estos algoritmos usaron diferentes combinaciones de cuatro motivos catalíticos diferentes para diseñar nuevas enzimas y 20 de los diseños seleccionados para la caracterización experimental tuvieron velocidades mejoradas cuatro veces con respecto a la reacción no catalizada (Jiang *et al.*, *Science* 319:1387-1391 (2008)). Por tanto, no sólo son capaces estos enfoques de modificación mediante ingeniería de expandir la serie de sustratos sobre los que puede actuar una enzima, sino que permite el diseño y la construcción de enzimas muy eficaces. Por ejemplo, se notificó que un método de intercambio de ADN (quimeragénesis al azar con moldes transitorios o RACHITT) conducía a una monooxigenasa modificada mediante ingeniería que tenía una velocidad de desulfuración mejorada con sustratos complejos así como una conversión 20 veces más rápida de un sustrato no natural (Coco *et al.* *Nat. Biotechnol.* 19:354-359 (2001)). De manera similar, la actividad específica de una enzima trifosfato isomerasa mutante lenta se mejoró hasta 19 veces desde 1,3 veces (Hermes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87:696-700 (1990)). Esta potenciación de la actividad específica se logró usando mutagénesis al azar a lo largo de toda la longitud de la proteína y la mejora podría remontarse a mutaciones en seis residuos de aminoácido.

También se ha demostrado la eficacia de los enfoques de modificación mediante ingeniería de proteínas para alterar la especificidad de sustrato de una enzima por un sustrato deseado. Se modificó isopropilmalato deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* cambiando residuos cerca del sitio activo de modo que podía actuar ahora sobre malato y D-lactato como sustratos (Fujita *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2695-2700 (2001)). En este estudio así como en otros, se destacó que podían modificarse uno o unos pocos residuos para alterar la especificidad de sustrato. Un caso concreto es la dihidroflavonol 4-reductasa para la que se cambió un solo aminoácido en la supuesta región de unión a sustrato que pudo reducir preferentemente dihidrokaempferol (Johnson *et al.*, *Plant J.* 25:325-333 (2001)). La especificidad de sustrato de una isocitrato deshidrogenasa muy específica de *Escherichia coli* se cambió de isocitrato a isopropilmalato cambiando un residuo en el sitio activo (Doyle *et al.*, *Biochemistry* 40:4234-4241 (2001)). De igual modo se alteró la especificidad de cofactor de una 1,5-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ a NADP⁺ cambiando unos pocos residuos cerca del extremo N-terminal (Cho *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 419:139-146 (2003)). Se usaron análisis de secuencia y análisis mediante modelado molecular para identificar los residuos clave para la modificación, que se estudiaron adicionalmente mediante mutagénesis dirigida al sitio.

Se hizo evolucionar una fucosidasa a partir de una galactosidasa en *E. coli* mediante intercambio de ADN y examen (Zhang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94:4504-4509 (1997)). De manera similar se convirtió aspartato aminotransferasa de *E. coli* en una tirosina aminotransferasa usando modelado de homología y mutagénesis dirigida al sitio (Onuffer *et al.*, *Protein Sci.* 4:1750-1757 (1995)). Se notifica que la mutagénesis dirigida al sitio de dos

residuos en el sitio activo de benzoilformiato descarboxilasa de *P. putida* alteró la afinidad (K_m) hacia sustratos naturales y no naturales (Siegert *et al.*, *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)). Se sometió la citocromo c peroxidasa (CCP) de *Saccharomyces cerevisiae* a evolución molecular dirigida para generar mutantes con actividad aumentada frente al sustrato clásico de peroxidasa, guayacol, cambiando así la especificidad de sustrato de CCP, de la proteína citocromo c a una molécula orgánica pequeña. Tras tres rondas de intercambio de ADN y examen, se aislaron mutantes que presentaban una actividad aumentada 300 veces frente a guayacol y una especificidad aumentada hasta 1000 veces para este sustrato con respecto a aquella para el sustrato natural (Iffland *et al.*, *Biochemistry* 39:10790-10798 (2000)).

En algunos casos se han obtenido enzimas con preferencias de sustrato diferentes de ambas enzimas parentales. Por ejemplo, se mejoró la degradación mediada por bifenil dioxigenasa de bifenilos policlorados mediante intercambio de genes de dos bacterias, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Burkholderia cepacia* (Kumamaru *et al.*, *Nat. Biotechnol* 16, 663-666 (1998)). Las bifenil oxigenasas quiméricas resultantes mostraron preferencias de sustrato diferentes de ambas enzimas parentales y potenciaron la actividad de degradación hacia compuestos de bifenilo relacionados e hidrocarburos de anillos aromáticos individuales tales como tolueno y benceno que eran originalmente malos sustratos para la enzima.

No sólo es posible cambiar la especificidad de enzima sino también potenciar las actividades sobre aquellos sustratos sobre los que las enzimas tienen de manera natural bajas actividades. Un estudio demostró que la aminoácido racemasa de *P. putida* que tenía amplia especificidad de sustrato (sobre lisina, arginina, alanina, serina, metionina, cisteína, leucina e histidina, entre otros) pero baja actividad hacia triptófano podía mejorarse significativamente mediante mutagénesis al azar (Kino *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:1299-1305 (2007)). De manera similar se modificó el sitio activo del BCKAD bovino por ingeniería para favorecer el sustrato alternativo acetil-CoA (Meng *et al.* *Biochemistry* 33:12879-12885 (1994)). Un aspecto interesante de estos enfoques es que aunque se han aplicado métodos al azar para generar estas enzimas mutadas con actividades eficaces pueden identificarse las mutaciones o los cambios estructurales exactos que confieren la mejora en la actividad. Por ejemplo, en el estudio mencionado anteriormente, pudo rastrearse el origen de las mutaciones que facilitaron la actividad mejorada sobre triptófano a dos posiciones diferentes.

También se ha usado evolución dirigida para expresar proteínas que son difíciles de expresar. Por ejemplo, sometiendo la peroxidasa del rábano a mutagénesis al azar y recombinación génica, pudieron extraerse mutantes que tenían más de 14 veces la actividad del tipo natural (Lin *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 15:467-471 (1999)).

Un ejemplo final de evolución dirigida muestra las extensas modificaciones a las que puede someterse una enzima para lograr una gama de funciones deseadas. Se sometió la enzima, lactato deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus*, a mutagénesis dirigida al sitio, y se realizaron tres sustituciones de aminoácido en sitios que se indicó que determinaban la especificidad hacia diferentes hidroxácidos (Clarke *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148:15-23 (1987)). Tras estas mutaciones la especificidad para oxaloacetato con respecto a piruvato se aumentó hasta 500 en contraposición con la enzima de tipo natural que tenía una especificidad catalítica para piruvato con respecto a oxaloacetato de 1000. Se modificó adicionalmente esta enzima por ingeniería usando mutagénesis dirigida al sitio para tener actividad hacia piruvatos sustituidos en la cadena ramificada (Wilks *et al.*, *Biochemistry* 29:8587-8591 (1990)). Específicamente, la enzima tenía una mejora de 55 veces en K_{cat} para alfa-cetoisocaproato. Se realizaron tres modificaciones estructurales en la misma enzima para cambiar su especificidad de sustrato de lactato a malato. La enzima era altamente activa y específica hacia malato (Wilks *et al.*, *Science* 242:1541-1544 (1988)). Posteriormente se modificó por ingeniería la misma enzima de *B. stearothermophilus* para tener alta actividad catalítica hacia alfa-ceto-ácidos con cadenas laterales con carga positiva, tales como aquellos que contienen grupos amonio (Hogan *et al.*, *Biochemistry* 34:4225-4230 (1995)). Mutantes con aminoácidos ácidos introducidos en la posición 102 de la enzima favorecieron la unión de tales grupos amonio de cadena lateral. Los resultados obtenidos demostraron que los mutantes mostraban mejoras de hasta 25 veces en los valores de k_{cat}/K_m para sustratos de omega-amino-alfa-ceto-ácidos. También se modificó estructuralmente esta enzima para funcionar como fenil-lactato deshidrogenasa en lugar de una lactato deshidrogenasa (Wilks *et al.*, *Biochemistry* 31:7802-7806 (1992)). Se introdujeron sitios de restricción en el gen para la enzima que permitieron escindir una región del gen. Esta región codificaba para un bucle en superficie móvil de polipéptido (residuos 98-110) que normalmente sella la vacuola del sitio activo frente a la masa de disolvente y es un determinante principal de la especificidad de sustrato. Se insertaron bucles de longitud y secuencia variables en el gen cortado y se usaron para sintetizar hidroxácido deshidrogenasas con especificidades de sustrato alteradas. Con una construcción de bucle más largo, la actividad con piruvato se redujo un millón de veces pero la actividad con fenilpiruvato permaneció en gran medida sin alterar. Se logró un cambio en la especificidad (k_{cat}/K_m) de 390.000 veces. La selectividad 1700:1 de esta enzima por fenilpiruvato con respecto a piruvato es la requerida en una fenil-lactato deshidrogenasa.

Tal como se indicó anteriormente, la evolución dirigida es un potente enfoque que implica la introducción de mutaciones dirigidas a un gen específico con el fin de mejorar y/o alterar las propiedades de una enzima. Pueden identificarse enzimas mejoradas y/o alteradas a través del desarrollo e implementación de ensayos de examen sensibles de alto rendimiento que permiten el examen automatizado de muchas variantes enzimáticas (por ejemplo, $>10^4$). Normalmente se realizan rondas iterativas de mutagénesis y examen para proporcionar una enzima con propiedades optimizadas. También se han desarrollado algoritmos computacionales que pueden ayudar a identificar

áreas del gen para la mutagénesis y pueden reducir significativamente el número de variantes enzimáticas que se necesita generar y examinar.

Se han desarrollado numerosas tecnologías de evolución dirigida (para revisiones, véase Hibbert, G. G., F. Baganz, H. C. Hailes, J. M. Ward, G. J. Lye, J. M. Woodley, y P. A. Dalby, 2005, Directed evolution of biocatalytic processes. *Biomol. Eng* 22:11-19; Huisman, G. W. y J. J. Lalonde, 2007, Enzyme evolution for chemical process applications, págs. 717-742. En R. N. Patel (ed.), *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries*. CRC Press; Otten, L. G. y W. J. Quax. 2005. Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol. Eng* 22:1-9; y Sen, S., D. Venkata, V. y B. Mandal, 2007, Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl Biochem. Biotechnol* 143:212-223) para ser eficaces en la creación de diversas bibliotecas de variantes y estos métodos se han aplicado satisfactoriamente a la mejora de una amplia gama de propiedades en muchas clases de enzimas

Las características enzimáticas que se han mejorado y/o alterado mediante tecnologías de evolución dirigida incluyen, por ejemplo, selectividad/especificidad (para la conversión de sustratos no naturales; estabilidad frente a la temperatura - para un procesamiento robusto a alta temperatura; estabilidad frente al pH - para el bioprocesamiento en condiciones de pH menor o mayor; tolerancia a sustrato o producto - de modo que pueden lograrse altos títulos de producto; unión (K_m) - amplía la unión a sustrato para incluir sustratos no naturales; inhibición (K_i) - para eliminar la inhibición mediante productos, sustratos, o productos intermedios clave; actividad (k_{cat}) - aumenta las velocidades de reacción enzimática para lograr el flujo deseado; niveles de expresión - aumenta los rendimientos de proteína y el flujo de la ruta global; estabilidad frente al oxígeno - para el funcionamiento de enzimas sensibles al aire en condiciones aerobias; y actividad anaerobia - para el funcionamiento de una enzima aerobia en ausencia de oxígeno.

Los siguientes métodos a modo de ejemplo se han desarrollado para la mutagénesis y diversificación de genes para obtener las propiedades deseadas seleccionadas como diana de enzimas específicas. Cualquiera de ellos puede usarse para alterar/optimizar la actividad de una enzima descarboxilasa.

EpPCR (Pritchard, L., D. Corne, D. Kell, J. Rowland, y M. Winson, 2005, A general model of error-prone PCR. *J Theor. Biol* 234:497-509) introduce mutaciones puntuales al azar mediante la reducción de la fidelidad de ADN polimerasa en reacciones de PCR mediante la adición de iones Mn^{2+} , mediante desplazamiento de las concentraciones de dNTP, o mediante otras variaciones de las condiciones. El procedimiento de clonación de cinco etapas para confinar la mutagénesis al gen de interés implica: 1) amplificación mediante PCR propensa a error del gen de interés; 2) digestión con enzima de restricción; 3) purificación en gel del fragmento de ADN deseado; 4) ligación en un vector; 5) transformación de las variantes génicas en un huésped y examen de la biblioteca para obtener un rendimiento mejorado. Este método puede generar múltiples mutaciones en un único gen de manera simultánea, lo cual puede ser útil. Puede generarse un alto número de mutantes mediante EpPCR, de modo que es útil un ensayo de examen de alto rendimiento o un método de selección (especialmente usando dispositivos robóticos) para identificar aquellos con características deseables.

La amplificación por círculo rodante propensa a error (epRCA) (Fujii, R., M. Kitaoka, y K. Hayashi, 2004, One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res* 32:e145; y Fujii, R., M. Kitaoka, y K. Hayashi, 2006, Error-prone rolling circle amplification: the simplest random mutagenesis protocol. *Nat. Protoc.* 1:2493-2497) tiene muchos de los mismos elementos que epPCR excepto porque se usa un plásmido circular completo como molde y se usan 6-meros aleatorios con uniones tiofosfato resistentes a una exonucleasa en los 2 últimos nucleótidos para amplificar el plásmido seguido por transformación en células en las que el plásmido vuelve a hacerse circular en repeticiones en tándem. Ajustar la concentración de Mn^{2+} puede hacer variar la tasa de mutación en cierta medida. Esta técnica usa un método de una etapa, propenso a error, sencillo, para crear una copia completa del plásmido con 3 - 4 mutaciones/kpb. No se requiere ninguna digestión con enzima de restricción ni cebadores específicos. Adicionalmente, este método está normalmente disponible como kit.

El intercambio de ADN o familia (Stemmer, W. P. 1994, DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91:10747-10751; y Stemmer, W. P. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391) normalmente implica la digestión de 2 ó más genes variantes con nucleasas tales como ADNasa I o EndoV para generar una combinación de fragmentos al azar que se reensamblan mediante ciclos de apareamiento y extensión en presencia de ADN polimerasa para crear una biblioteca de genes quiméricos. Los fragmentos se ceban unos a otros y se produce recombinación cuando una copia ceba a otra copia (cambio de molde). Este método puede usarse con secuencias de ADN de >1 kpb. Además de recombinantes mutacionales creados mediante reensamblaje de fragmento, este método introduce mutaciones puntuales en las etapas de extensión a una tasa similar a la PCR propensa a error. El método puede usarse para eliminar mutaciones neutras al azar perjudiciales que pueden conferir antigenicidad.

La extensión escalonada (StEP) (Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter, y F. H. Arnold, 1998, Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotechnol* 16:258-261) conlleva el cebado de molde seguido por ciclos repetidos de PCR de 2 etapas con desnaturalización y una duración muy corta de apareamiento/extensión (de tan sólo 5 s). Los fragmentos en crecimiento se aparean con diferentes moldes y se extienden adicionalmente, lo cual se repite hasta que se producen secuencias de longitud completa. El cambio de

moldes significa que la mayoría de los fragmentos resultantes tienen múltiples fragmentos parentales. Las combinaciones de polimerasas de baja fidelidad (Taq y Mutazyme) reducen los sesgos propensos a error debido a espectros mutacionales opuestos.

5 En la recombinación por cebado al azar (RPR) se usan cebadores con secuencia al azar para generar muchos fragmentos de ADN cortos complementarios a diferentes segmentos del molde. (Shao, Z., H. Zhao, L. Giver, y F. H. Arnold, 1998, Random-priming *in vitro* recombination: an effective tool for directed evolution. Nucleic Acids Res 26:681-683). La incorporación errónea de bases y el cebado erróneo mediante epPCR proporcionan mutaciones puntuales. Los fragmentos de ADN cortos se ceban unos a otros basándose en homología y se recombinan y se
10 ensamblan para dar longitud completa mediante termociclado repetido. La eliminación de moldes antes de esta etapa garantiza pocos recombinantes parentales. Este método, como muchos otros, puede realizarse a lo largo de múltiples iteraciones para hacer evolucionar distintas propiedades. Esta tecnología evita el sesgo de secuencia, es independiente de la longitud del gen, y requiere muy poco ADN parental para la aplicación.

15 En la recombinación de heterodúplex se usa ADN de plásmido linealizado para formar heterodúplex que se reparan mediante reparación con emparejamiento erróneo. (Volkov, A. A., Z. Shao, y F. H. Arnold. 1999. Recombination and chimeragenesis by *in vitro* heteroduplex formation and *in vivo* repair. Nucleic Acids Res 27:e18; y Volkov, A. A., Z. Shao, y F. H. Arnold. 2000. Random chimeragenesis by heteroduplex recombination. Methods Enzymol. 328:456-463). La etapa de reparación con emparejamiento erróneo es al menos algo mutagénica. Los heterodúplex se transforman más eficazmente que homodúplex lineales. Este método es adecuado para genes grandes y operones completos.

La quimeragénesis al azar con moldes transitorios (RACHITT) (Coco, W. M., W. E. Levinson, M. J. Crist, H. J. Hektor, A. Darzins, P. T. Pienkos, C. H. Squires, y D. J. Monticello, 2001, DNA shuffling method for generating highly
25 recombined genes and evolved enzymes. Nat. Biotechnol 19:354-359) emplea fragmentación con ADNasa I y fraccionamiento por tamaños de ADNmc. Se hibridan fragmentos homólogos en ausencia de polimerasa para dar un andamiaje de ADNmc complementario. Todos los extremos de fragmentos sin hibridar solapantes se cortan mediante una exonucleasa. Se rellenan huecos entre fragmentos, y después se ligan para dar una combinación de diversas cadenas de longitud completa hibridadas con el andamiaje (que contiene U para excluir amplificación).
30 Después se destruye el andamiaje y se sustituye por una nueva cadena complementaria a la cadena diversa mediante amplificación por PCR. El método implica una cadena (andamiaje) que es de tan sólo una secuencia parental mientras que los fragmentos de cebado se derivan de otros genes frente a los que se selecciona el andamiaje parental. Por tanto, no se produce ningún nuevo apareamiento con fragmentos parentales. Los fragmentos solapantes se cortan con una exonucleasa. Por lo demás, esto es conceptualmente similar al intercambio de ADN y StEP. Por tanto, no debe haber secuencias hermanas, pocas secuencias inactivas, y ninguna
35 secuencia parental sin someterse a intercambio. Esta técnica tiene ventajas en cuanto a que se crean pocos o ningún gen parental y pueden obtenerse como resultado muchos más cruces con respecto al intercambio de ADN convencional.

40 La extensión recombinada con moldes truncados (RETT) conlleva cambio de molde de cadenas de cebadores que crecen de manera unidireccional en presencia de fragmentos de ADNmc unidireccional usados como combinación de moldes. (Lee, S. H., E. J. Ryu, M. J. Kang, E.-S. Wang, Z. C. Y. Piao, K. J. J. Jung, e Y. Shin, 2003, A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT). J. Molec. Catalysis 26:119-129). No se usa ninguna ADN endonucleasa. Se produce ADNmc unidireccional mediante ADN polimerasa
45 con cebadores al azar o delección en serie con exonucleasa. Los ADNmc unidireccionales sólo son moldes y no cebadores. El cebado al azar y las exonucleasas no introducen sesgo de secuencia como sucede con la escisión enzimática de intercambio de ADN/RACHITT. RETT puede ser más fácil de optimizar que StEP porque usa condiciones de PCR normales en lugar de extensiones muy cortas. Se produce recombinación como componente de las etapas de PCR, sin intercambio directo. Este método también puede ser más aleatorio que StEP debido a la
50 ausencia de pausas.

En el intercambio de genes con oligonucleótidos degenerados (DOGS), se usan cebadores degenerados para controlar la recombinación entre moléculas; (Bergquist, P. L. y M. D. Gibbs, 2007, Degenerate oligonucleotide gene shuffling. Methods Mol. Biol 352:191-204; Bergquist, P. L., R. A. Reeves, y M. D. Gibbs, 2005, Degenerate
55 oligonucleotide gene shuffling (DOGS) and random drift mutagenesis (RNDM): two complementary techniques for enzyme evolution. Biomol. Eng 22:63-72; Gibbs, M. D., K. M. Nevalainen, y P. L. Bergquist, 2001, Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. Gene 271:13-20), esto se puede usar para controlar la tendencia de otros métodos tales como intercambio de ADN para regenerar genes parentales. Este método puede combinarse con la mutagénesis al azar (epPCR) de segmentos génicos seleccionados. Puede ser un buen método para bloquear la reformación de secuencias parentales. No se necesitan endonucleasas. Ajustando las concentraciones de entrada de segmentos producidos, puede crearse sesgo hacia una estructura principal deseada. Este método permite el intercambio de ADN de secuencias parentales no relacionadas sin digestión con enzimas de restricción y permite una elección de métodos de mutagénesis al azar.

65 El truncamiento incremental para la creación de enzimas híbridas (ITCHY) crea una biblioteca combinatoria con

deleciones de 1 par de bases de un gen o fragmento génico de interés. (Ostermeier *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96:3562-3567 (1999); Ostermeier *et al.*, 1999 *Nat. Biotechnol.* 17:1205-1209 (1999)). Se introducen truncamientos en sentido opuesto en fragmentos de 2 genes diferentes. Se ligan entre sí y se clonan las fusiones. Esta técnica no requiere homología entre los 2 genes parentales. Cuando se combina ITCHY con intercambio de ADN, el sistema se denomina SCRATCHY (véase a continuación). Una ventaja principal de los dos es que no se necesita homología entre genes parentales; por ejemplo, se crearon fusiones funcionales entre un gen de *E. coli* y uno humano mediante ITCHY. Cuando se producen bibliotecas de ITCHY se capturan todos los cruces posibles.

El tio-truncamiento incremental para la creación de enzimas híbridas (TIO-ITCHY) es casi igual que ITCHY excepto porque se usan dNTP de fosfotioato para generar truncamientos. (Lutz, S., M. Ostermeier, y S. J. Benkovic, 2001, *Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothioate nucleotides. Nucleic Acids Res* 29:E16). Con respecto a ITCHY, TIO-ITCHY puede ser más fácil de optimizar, proporcionar más reproducibilidad y capacidad de ajuste.

SCRATCHY (ITCHY combinado con intercambio de ADN) es una combinación de intercambio de ADN e ITCHY; por tanto, permite múltiples cruces. (Lutz *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98:11248-11253 (2001)). SCRATCHY combina las mejores características de ITCHY e intercambio de ADN. Pueden usarse predicciones computacionales en la optimización. SCRATCHY es más eficaz que el intercambio de ADN cuando la identidad de secuencia es inferior al 80%.

En la mutagénesis por deriva al azar (RNDM) se producen mutaciones mediante epPCR seguido por examen/selección de aquellas que conservan actividad útil. (Bergquist *et al.*, *Biomol. Eng.* 22:63-72 (2005)). Después, se usan en DOGS para generar recombinantes con fusiones entre múltiples mutantes activos o entre mutantes activos y algunas otras secuencias parentales deseables. Diseñado para fomentar el aislamiento de mutaciones neutras; su propósito es examinar para detectar actividad catalítica retenida ya sea esta actividad mayor o menor que en el gen original. RNDM puede usarse en ensayos de alto rendimiento cuando el examen es capaz de detectar actividad por encima del fondo. RNDM se usa como punto de partida para DOGS en la generación de diversidad. La técnica impone un requisito para la actividad antes del intercambio u otras etapas posteriores; se indica que las bibliotecas de deriva neutras dan como resultado mejoras mayores/más rápidas en la actividad a partir de bibliotecas más pequeñas. Aunque se publica usando epPCR, también puede aplicarse a otros métodos de mutagénesis a gran escala.

La mutagénesis por saturación de secuencia (SeSaM) es un método de mutagénesis al azar que: 1) genera una combinación de fragmentos de longitud al azar usando incorporación al azar de un nucleótido de fosfotioato y escisión; esta combinación se usa como molde para 2) la extensión en presencia de bases "universales" tales como inosina; 3) la replicación de un complemento que contiene inosina proporciona incorporación de bases al azar incorporación y, por consiguiente, mutagénesis. (Wong *et al.*, *Biotechnol J.* 3:74-82 (2008); Wong *Nucleic Acids Res* 32:e26; Wong *et al.*, *Anal. Biochem.* 341:187-189 (2005)). Usando esta técnica puede ser posible generar una gran biblioteca de mutantes en el plazo de 2-3 días usando métodos sencillos. En gran medida no está muy dirigida en comparación con el sesgo mutacional de ADN polimerasas. Las diferencias en este enfoque hacen que esta técnica sea complementaria (o alternativa) a epPCR.

En el intercambio sintético se diseñan oligonucleótidos solapantes para codificar para "toda la diversidad genética en dianas" y permitir una diversidad muy alta para la progenie sometida a intercambio. (Ness, *et al.*, *Nat. Biotechnol* 20:1251-1255 (2002)). En esta técnica pueden diseñarse los fragmentos que van a someterse a intercambio. Esto ayuda a aumentar la diversidad resultante de la progenie. Pueden diseñarse sesgos de secuencias/codones para producir secuencias relacionadas de manera más distante que se recombinan a tasas que se aproximan a secuencias relacionadas más estrechamente y no se requiere que presenten físicamente los genes del molde.

La tecnología de intercambio y escisión de nucleótidos NextT aprovecha una combinación de incorporación de dUTP seguido por tratamiento con uracil ADN glicosilasa y después piperidina para realizar fragmentación de ADN de punto final. (Muller *et al.*, *Nucleic Acids Res* 33:e117 (2005)). El gen vuelve a ensamblarse usando extensión con cebadores de PCR internos con polimerasa de corrección de lectura. Los tamaños para el intercambio pueden controlarse directamente usando proporciones variables de dUPT:dTTP. Esta es una reacción de punto final que usa métodos sencillos para la incorporación de uracilo y la escisión. Con este método pueden usarse otros análogos de nucleótido tales como 8-oxoguanina. Adicionalmente, la técnica funciona bien con fragmentos muy cortos (86 pb) y tiene una baja tasa de errores. La escisión química de ADN significa muy pocos clones no sometidos a intercambio.

En la recombinación de proteínas independiente de la homología de secuencia (SHIPREC) se usa un grupo de unión para facilitar la fusión entre 2 genes relacionados de manera distante/no relacionados; se usa un tratamiento con nucleasa para generar una gama de quimeras entre los dos. El resultado es una biblioteca de cruce individual de estas fusiones. (Sieber, V., C. A. Martinez, y F. H. Arnold. 2001. *Libraries of hybrid proteins of distantly related sequences. Nat. Biotechnol* 19:456-460). Esto produce un tipo limitado de intercambios; la mutagénesis es un procedimiento separado. Esta técnica puede crear una biblioteca de quimeras con fracciones variables de cada uno de 2 genes parentales no relacionados. No se necesita homología. Se sometió a prueba SHIPREC con un dominio de unión a hemo de un CP450 bacteriano fusionado a regiones N-terminales de un CP450 de mamífero; esto

produjo actividad en mamíferos en una enzima más soluble.

En la mutagénesis por saturación de sitio génico (GSSM) los materiales de partida son un plásmido de ADNbc superenrollado con inserción y 2 cebadores degenerados en el sitio deseado para mutaciones. (Kretz, K. A., T. H. Richardson, K. A. Gray, D. E. Robertson, X. Tan, y J. M. Short, 2004, Gene site saturation mutagenesis: a comprehensive mutagenesis approach. *Methods Enzymol.* 388:3-11). Los cebadores portan la mutación de interés y se aparean con la misma secuencia en cadenas opuestas de ADN; mutación en el centro del cebador y ~20 nucleótidos de secuencia correcta que flanquean a cada lado. La secuencia en el cebador es NNN o NNK (codificante) y MNN (no codificante) (N = las 4, K = G, T, M = A, C). Tras la extensión, se usa DpnI para digerir ADN metilado mediante dam para eliminar el molde de tipo natural. Esta técnica explora todas las posibles sustituciones de aminoácido en un locus dado (es decir, un codón). La técnica facilita la generación de todos los posibles remplazos en un sitio sin codones sin sentido y una representación igual o casi igual de los alelos más posibles. No requiere conocimiento previo de la estructura, mecanismo o dominios de la enzima diana. Si va seguida por intercambio o reensamblaje génico, esta tecnología crea una biblioteca diversa de recombinantes que contiene todas las posibles combinaciones de mutaciones aceleradoras de sitio individual. La utilidad de esta combinación de tecnologías se ha demostrado para la evolución satisfactoria de más de 50 enzimas diferentes, y también para más de una propiedad en una enzima dada.

La mutagénesis de casete combinatorio (CCM) implica el uso de casetes oligonucleotídicos cortos para sustituir a regiones limitadas con un gran número de alteraciones de secuencia de aminoácidos posibles. (Reidhaar-Olson, J. F., J. U. Bowie, R. M. Breyer, J. C. Hu, K. L. Knight, W. A. Lim, M. C. Mossing, D. A. Parsell, K. R. Shoemaker, y R. T. Sauer, 1991, Random mutagenesis of protein sequences using oligonucleotide cassettes. *Methods Enzymol.* 208:564-586; y Reidhaar-Olson, J. F. y R. T. Sauer, 1988, Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. *Science* 241:53-57). Son posibles sustituciones simultáneas en 2 ó 3 sitios usando esta técnica. Adicionalmente, el método somete a prueba una gran multiplicidad de posibles cambios de secuencia en un intervalo limitado de sitios. Se ha usado para explorar el contenido de información del dominio de unión a ADN de represor lambda.

La mutagénesis de casete múltiple combinatoria (CMCM) es esencialmente similar a CCM excepto porque se emplea como parte de un programa más grande: 1) uso de epPCR a alta tasa de mutación para 2) identificar puntos calientes y regiones calientes y después 3) extensión mediante CMCM para cubrir una región definida de espacio de secuencia de proteína. (Reetz, M. T., S. Wilensek, D. Zha, y K. E. Jaeger, 2001, Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591). Como con CCM, este método puede someter a prueba prácticamente todas las alteraciones posibles a lo largo de una región diana. Si se usa junto con métodos para crear mutaciones al azar y genes sometidos a intercambio, proporciona un medio excelente de generación de proteínas diversas sometidas a intercambio. Este enfoque fue satisfactorio para aumentar, en 51 veces, la enantioselectividad de una enzima.

En la técnica de cepas mutantes plásmidos mutantes *ts* condicionales permiten aumentos de 20 a 4000 veces en la frecuencia de mutación al azar y natural durante la selección y bloquear la acumulación de mutaciones perjudiciales cuando no se requiere selección. (Selifonova, O., F. Valle, y V. Schellenberger, 2001, Rapid evolution of novel traits in microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 67:3645-3649). Esta tecnología se basa en un gen *mutD5* derivado de plásmido, que codifica para una subunidad mutante de ADN polimerasa III. Esta subunidad se une a ADN polimerasa III endógena y pone en peligro la capacidad de corrección de lectura de polimerasa III en cualquiera de las cepas que alojan el plásmido. Se produce un amplio espectro de sustituciones de bases y mutaciones del marco de lectura. Con el fin de usarse eficazmente, el plásmido mutante debe eliminarse una vez obtenido el fenotipo deseado; esto se logra a través de un origen de replicación sensible a la temperatura, que permite el curado del plásmido a 41°C. Debe indicarse que se han explorado cepas mutantes desde hace bastante tiempo (por ejemplo, véase Winter y colaboradores, 1996, *J. Mol. Biol.* 260, 359-3680). En esta técnica se observan tasas de mutación espontánea muy altas. La propiedad condicional minimiza las mutaciones de fondo no deseadas. Esta tecnología puede combinarse con evolución adaptativa para potenciar las tasas de mutagénesis y lograr más rápidamente fenotipos deseados.

La mutagénesis revisada (LTM) es un método de mutagénesis multidimensional que evalúa y optimiza las mutaciones combinatorias de aminoácidos seleccionados. (Rajpal, A., N. Beyaz, L. Haber, G. Cappuccilli, H. Yee, R. R. Bhatt, T. Takeuchi, R. A. Lerner, y R. Crea, 2005, A general method for greatly improving the affinity of antibodies using combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102:8466-8471). En lugar de saturar cada sitio con todos los cambios de aminoácido posibles, se elige un conjunto de 9 para cubrir la gama de química del grupo R de aminoácidos. Menos cambios por sitio permiten someter múltiples sitios a este tipo de mutagénesis. Se ha logrado un aumento de >800 veces en la afinidad de unión para un anticuerpo de nanomolar bajo a picomolar a través de este método. Este es un enfoque racional para minimizar el número de combinaciones al azar y debe aumentar la capacidad para encontrar rasgos mejorados reduciendo enormemente los números de clones que deben examinarse. Se ha aplicado a la modificación por ingeniería de anticuerpos, específicamente para aumentar la afinidad de unión y/o reducir la disociación. La técnica puede combinarse o bien con exámenes o bien con selecciones.

El reensamblaje génico es un método de intercambio de ADN que puede aplicarse a múltiples genes en un momento o para crear una gran biblioteca de quimeras (múltiples mutaciones) de un único gen (en la World Wide Web en www.verenium.com/Pages/Technology/EnzymeTech/TechEnzyTGR.html). Normalmente esta tecnología se usa en combinación con examen de ultra-alto rendimiento para consultar el espacio de secuencia representado para detectar mejoras deseadas. Esta técnica permite múltiple recombinación génica independientemente de la homología. El número y la posición exactos de acontecimientos de cruce pueden predeterminarse usando fragmentos diseñados mediante análisis bioinformático. Esta tecnología conduce a un nivel muy alto de diversidad prácticamente sin reformación del gen parental y un nivel bajo de genes inactivos. En combinación con GSSM, puede someterse a prueba una gran gama de mutaciones para detectar actividad mejorada. El método permite la "combinación" y el "ajuste fino" de intercambio de ADN, por ejemplo puede optimizarse el uso de codones.

La automatización del diseño de proteínas *in silico* PDA es un algoritmo de optimización que ancla la estructura principal de proteína estructuralmente definida que presenta un plegamiento particular, y busca en el espacio de secuencia sustituciones de aminoácido que pueden estabilizar el plegamiento y la energía global de la proteína. (Hayes, R. J., J. Bentzien, M. L. Ary, M. Y. Hwang, J. M. Jacinto, J. Vielmetter, A. Kundu, y B. I. Dahiyat, 2002, Combining computational and experimental screening for rapid optimization of protein properties. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99:15926-15931). Esta tecnología permite predicciones de entropía basadas en la estructura *in silico* con el fin de buscar tolerancia estructural frente a variaciones de aminoácidos de proteínas. Se aplica mecánica estadística para calcular interacciones de acoplamiento en cada posición (la tolerancia estructural frente a sustitución de aminoácido es una medida del acoplamiento). En última instancia, esta tecnología está diseñada para proporcionar modificaciones deseadas de propiedades de proteínas mientras que se mantiene la integridad de las características estructurales. El método evalúa computacionalmente y permite filtrar un número muy grande de variantes de secuencia posibles (10^{50}). La elección de variantes de secuencia para someter a prueba está relacionada con predicciones basadas en la termodinámica más favorable y aparentemente sólo la estabilidad o las propiedades que están relacionadas con la estabilidad pueden abordarse eficazmente con esta tecnología. El método se ha usado satisfactoriamente en algunas proteínas terapéuticas, especialmente en la modificación por ingeniería de inmunoglobulinas. Las predicciones *in silico* evitan someter a prueba números extraordinariamente grandes de posibles variantes. Las predicciones basadas en estructuras tridimensionales existentes es más probable que sean satisfactorias que las predicciones basadas en estructuras hipotéticas. Esta tecnología puede predecir y permitir fácilmente el examen dirigido de múltiples mutaciones simultáneas, algo que no es posible con tecnologías puramente experimentales debido a los aumentos exponenciales de los números.

La mutagénesis por saturación iterativa (ISM) implica 1) usar el conocimiento de estructura/función para elegir un sitio probable para la mejora de la enzima. 2) Realizar la mutagénesis por saturación en el sitio elegido usando Stratagene QuikChange (u otros medios adecuados). 3) Examinar/seleccionar propiedades deseadas. 4) Con clon(es) mejorado(s), volver a empezar en otro sitio y seguir repitiendo. (Reetz, M. T. y J. D. Carballeira, 2007, Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protoc.* 2:891-903; y Reetz, M. T., J. D. Carballeira, y A. Vogel, 2006, Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45:7745-7751). Esta es una metodología demostrada que garantiza que se realicen todas las sustituciones posibles en una posición dada para examen/selección.

Cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para mutagénesis puede usarse solo o en cualquier combinación. Adicionalmente, puede usarse cualquiera o una combinación de los métodos de evolución dirigida junto con técnicas de evolución adaptativa.

Para generar mejores productores, puede usarse un modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. También puede usarse modelado para diseñar las desactivaciones génicas que optimizan adicionalmente el uso de la ruta (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y la patente estadounidense nº 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento celular del desplazamiento en el metabolismo hacia la producción más eficaz de 1,3-butanodiol.

Un método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la biosíntesis de un producto deseado es la plataforma computacional OptKnock (Burgard *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)). OptKnock es un programa de simulación y modelado metabólico que sugiere estrategias de delección de genes que dan como resultado microorganismos genéticamente estables que sobreproducen el producto diana. Específicamente, la plataforma examina el entramado metabólico y/o bioquímico completo de un microorganismo con el fin de sugerir manipulaciones genéticas que fuerzan que el producto bioquímico deseado se convierta en un subproducto obligatorio del crecimiento celular. Al acoplar la producción de producto bioquímico con el crecimiento celular a través de delecciones génicas estratégicamente colocadas u otra perturbación génica funcional, las presiones de selección de crecimiento impuestas sobre las cepas modificadas por ingeniería tras largos periodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción de producto bioquímico acoplada con el crecimiento obligatoria. Por último, cuando se construyen delecciones génicas hay una posibilidad despreciable de que las cepas diseñadas reviertan a sus estados de tipo natural porque los genes

seleccionados mediante OptKnock tienen que eliminarse completamente del genoma. Por tanto, esta metodología computacional puede o bien usarse para identificar rutas alternativas que conducen a la biosíntesis de un producto deseado o bien usarse en relación con los organismos microbianos que se producen de manera no natural para la optimización adicional de biosíntesis de un producto deseado.

En resumen, OptKnock es un término usado en el presente documento para hacer referencia a un método y sistema computacional para modelar el metabolismo celular. El programa OptKnock se refiere a una plataforma de modelos y métodos que incorporan restricciones particulares en modelos de análisis de equilibrio de flujos (FBA). Estas restricciones incluyen, por ejemplo, información cinética cualitativa, información reguladora cualitativa y/o datos experimentales de micromatriz de ADN. OptKnock también calcula soluciones a diversos problemas metabólicos, por ejemplo, estrechando los límites de flujo derivados a través de modelos de equilibrio de flujos y analizando posteriormente con sonda los límites de rendimiento de redes metabólicas en presencia de adiciones o deleciones de genes. La plataforma computacional OptKnock permite la construcción de formulaciones de modelo que permiten una consulta eficaz de los límites de rendimiento de redes metabólicas y proporciona métodos para resolver los problemas de programación lineales de números enteros mixtos resultantes. Los métodos de modelado metabólico y simulación que se denominan OptKnock en el presente documento se describen, por ejemplo, en los documentos U.S. 2002/0168654, WO 2002/055995, y U.S. 2009/0047719.

Otro método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la producción biosintética de un producto es un sistema de modelado metabólico y simulación denominado SimPheny®. Este método y sistema computacional se describe, por ejemplo, en el documento U.S. 2003/0233218, presentado el 14 de junio de 2002, y en el documento WO/2003/106998. SimPheny® es un sistema computacional que puede usarse para producir un modelo de red *in silico* y para simular el flujo de masa, energía o carga a través de las reacciones químicas de un sistema biológico para definir un espacio de soluciones que contiene todas y cada una de las funcionalidades posibles de las reacciones químicas en el sistema, determinando así un intervalo de actividades permitidas para el sistema biológico. Este enfoque se denomina modelado basado en restricciones porque el espacio de soluciones se define mediante restricciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas así como restricciones de capacidad y termodinámica de reacción asociadas con flujos máximos por las reacciones. El espacio definido mediante estas restricciones puede consultarse para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos.

Estos enfoques computacionales son compatibles con realidades biológicas porque los sistemas biológicos son flexibles y pueden alcanzar el mismo resultado de muchas maneras diferentes. Los sistemas biológicos se diseñan mediante mecanismos evolutivos que se han restringido mediante restricciones fundamentales a las que deben enfrentarse todos los sistemas vivos. Por tanto, la estrategia de modelado basada en restricciones abarca estas realidades generales. Además, la capacidad de imponer de manera continua restricciones adicionales sobre un modelo de red mediante el ajuste de las restricciones da como resultado una reducción en el tamaño del espacio de soluciones, potenciando así la precisión con la que puede predecirse el fenotipo o rendimiento fisiológico.

Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica podrán aplicar diversas plataformas computacionales para el modelado metabólico y simulación para diseñar e implementar la biosíntesis de un compuesto deseado en organismos microbianos huéspedes. Tales métodos de modelado metabólico y simulación incluyen, por ejemplo, los sistemas computacionales ejemplificados anteriormente como SimPheny® y OptKnock. Para la ilustración de la invención, en el presente documento se describen algunos métodos con referencia a la plataforma computacional OptKnock para modelado y simulación. Los expertos en la técnica sabrán cómo aplicar la identificación, el diseño y la implementación de las alteraciones metabólicas usando OptKnock a cualquiera de tales otras plataformas y métodos computacionales de modelado metabólico y simulación bien conocidos en la técnica.

Los métodos descritos anteriormente proporcionarán un conjunto de reacciones metabólicas para perturbar. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto o modificación metabólica puede dar como resultado un producto deseado como un producto obligatorio durante la fase de crecimiento del organismo. Dado que las reacciones se conocen, una solución al problema de OptKnock de dos niveles también proporcionará el gen o los genes asociados que codifican para una o más enzimas que catalizan cada reacción dentro del conjunto de reacciones. La identificación de un conjunto de reacciones y sus correspondientes genes que codifican para las enzimas que participan en cada reacción es generalmente un procedimiento automático, que se logra a través de la correlación de las reacciones con una base de datos de reacciones que tiene una relación entre enzimas y genes codificantes.

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que tienen que perturbarse con el fin de lograr la producción de un producto deseado se implementa en la célula o organismo diana mediante perturbación funcional de al menos un gen que codifica para cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio particularmente útil para lograr la perturbación funcional del conjunto de reacciones es mediante deleción de cada gen codificante. Sin embargo, en algunos casos, puede ser beneficioso perturbar la reacción mediante otras aberraciones genéticas incluyendo, por ejemplo, mutación, deleción de regiones reguladoras tales como promotores o sitios de unión en *cis* para factores reguladores, o mediante truncamiento de la secuencia codificante en cualquiera de varias ubicaciones. Estas últimas aberraciones, que dan como resultado una deleción menor que la total del conjunto de genes, pueden ser útiles, por

ejemplo, cuando se desean evaluaciones rápidas del acoplamiento de un producto o cuando es menos probable que se produzca reversión genética.

Para identificar soluciones productoras adicionales para el problema de OptKnock de dos niveles descrito anteriormente que conducen a conjuntos adicionales de reacciones que van a perturbarse o modificaciones metabólicas que pueden dar como resultado la biosíntesis, incluyendo la biosíntesis acoplada con el crecimiento de un producto deseado, puede implementarse un método de optimización, denominado cortes de números enteros. Este método avanza resolviendo de manera iterativa el problema de OptKnock ejemplificado anteriormente con la incorporación de una restricción adicional denominada corte de números enteros comunes en cada iteración. Las restricciones de corte de números enteros evitan eficazmente que el procedimiento de solución elija exactamente el mismo conjunto de reacciones identificado en cualquier iteración anterior que acopla obligatoriamente la biosíntesis de producto con el crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica acoplada con el crecimiento anteriormente identificada especifica las reacciones 1, 2 y 3 para su perturbación, entonces las siguientes restricciones evitan que se consideren simultáneamente las mismas reacciones en soluciones posteriores. El método de corte de números enteros se conoce bien en la técnica y puede encontrarse descrito, por ejemplo, en Burgard *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 17:791-797 (2001). Como con todos los métodos descritos en el presente documento con referencia a su uso en combinación con la plataforma computacional OptKnock para modelado metabólico y simulación, el método de corte de números enteros de reducción de la redundancia en el análisis computacional iterativo también puede aplicarse con otras plataformas computacionales bien conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, SimPheny®.

Los métodos ejemplificados en el presente documento permiten la construcción de células y organismos que producen de manera biosintética un producto deseado, incluyendo el acoplamiento obligatorio de la producción de un producto bioquímico diana con el crecimiento de la célula o el organismo modificado por ingeniería para albergar las alteraciones genéticas identificadas. Por tanto, los métodos computacionales descritos en el presente documento permiten la identificación e implementación de modificaciones metabólicas que se identifican mediante un método *in silico* seleccionado de OptKnock o SimPheny®. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir, por ejemplo, adición de una o más enzimas de ruta de biosíntesis y/o perturbación funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, perturbación mediante delección génica.

Tal como se comentó anteriormente, la metodología de OptKnock se desarrolló con la premisa de que pueden hacerse evolucionar redes microbianas mutantes hacia sus fenotipos de crecimiento máximo predichos de manera computacional cuando se someten a largos periodos de selección de crecimiento. En otras palabras, el enfoque hace uso de la capacidad de un organismo para auto-optimizarse con presiones selectivas. La plataforma OptKnock permite la enumeración exhaustiva de combinaciones de delecciones génicas que fuerzan un acoplamiento entre la producción de producto bioquímico y el crecimiento celular basándose en la estequiometría de la red. La identificación de desactivaciones óptimas de genes/reacciones requiere la resolución de un problema de optimización de dos niveles que elige el conjunto de reacciones activas de tal manera que una solución de crecimiento óptimo para la red resultante sobreproduce el producto bioquímico de interés (Burgard *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 84:647-657 (2003)).

Puede emplearse un modelo estequiométrico *in silico* del metabolismo de *E. coli* para identificar genes esenciales para rutas metabólicas tal como se ejemplificó anteriormente y se describe, por ejemplo, en las publicaciones de patente estadounidense 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 estadounidense nº 7.127.379. Tal como se divulga en el presente documento, la plataforma matemática OptKnock puede aplicarse para precisar delecciones génicas que conducen a la producción acoplada con el crecimiento de un producto deseado. Además, la solución del problema de OptKnock de dos niveles sólo proporciona un conjunto de delecciones. Para enumerar todas las soluciones significativas, es decir, todos los conjuntos de desactivaciones que conducen a la formación de producción acoplada con el crecimiento, puede implementarse una técnica de optimización, denominada cortes de números enteros. Esto conlleva resolver iterativamente el problema de OptKnock con la incorporación de una restricción adicional denominada corte de números enteros comunes en cada iteración, tal como se comentó anteriormente.

Por consiguiente, se pretende que los siguientes ejemplos ilustren, pero no limiten, la presente invención.

Ejemplo I de referencia

Síntesis 1,3-butanodiol por medio de alanina

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano que puede producir 1,3-butanodiol usando la ruta de alanina en la figura 1 por medio de las etapas A, B, C, D y H.

Se usa *Escherichia coli* como organismo diana para modificar por ingeniería genética una ruta de producción de 1,3-butanodiol tal como se muestra en la figura 1. *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo que se produce de manera no natural que puede producir 1,3-butanodiol. *E. coli* es propenso a manipulación

genética y se sabe que puede producir diversos productos, como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, eficazmente en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada por ingeniería genética para producir 1,3-butanodiol, se expresan en *E. coli* ácidos nucleicos que codifican para las enzimas utilizadas en la ruta de alanina tal como se describió anteriormente, usando técnicas de biología molecular bien conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente, 2001; Ausubel citado anteriormente, 1999; Roberts *et al.*, citado anteriormente, 1989).

En particular, se clonan los genes *ortA* (YP_001086914.1), *ortB* (YP_001086915.1), *dat* (P19938) y *pdh* (P06672) que codifican para las actividades AKP tiolasa, AKP aminotransferasa y 2,4-dioxopentanoato descarboxilasa, respectivamente, en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Además, se clonan los genes *yqhD* (NP_417484.1) y *adh* (AAA23199.2) que codifican para 3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído) y 4-hidroxi-2-butanona reductasa, respectivamente en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Los dos conjuntos de plásmidos se transforman en la cepa de *E. coli* MG1655 para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de 1,3-butanodiol por medio de la ruta de alanina. Obsérvese que *E. coli* presenta la capacidad para formar D-alanina.

El organismo modificado genéticamente resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos bien conocidos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente, 2001). La expresión de genes de la ruta de alanina se corrobora usando métodos bien conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, incluyendo por ejemplo, transferencias de tipo Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencia. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman usando ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada por ingeniería genética para producir 1,3-butanodiol se confirma usando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (CGEM) o cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CLEM).

Las cepas microbianas modificadas por ingeniería genética para tener una ruta de biosíntesis de 1,3-butanodiol funcional se aumentan adicionalmente mediante optimización para lograr una utilización eficaz de la ruta. En resumen, la cepa modificada por ingeniería genética se evalúa para determinar si cualquiera de los genes exógenos se expresan a un nivel limitante de la velocidad. Se aumenta la expresión para cualquier enzima expresada a bajos niveles que pueden limitar el flujo a través de la ruta mediante, por ejemplo, la introducción de números de copias adicionales del gen.

Para generar mejores productores, se utiliza modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. Se usa también modelado para diseñar desactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la utilización de la ruta (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense 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 estadounidense nº 7.127.379). El análisis del modelado permite predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficaz de 1,3-butanodiol. Un método de modelado es el enfoque de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard *et al.*, Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar desactivaciones génicas que dan como resultado colectivamente una mejor producción de 1,3-butanodiol. También puede usarse evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, productos intermedios alanina o 2-amino-4-oxopentanoato o el producto 1,3-butanodiol. La evolución adaptativa se realiza para mejorar tanto las características de crecimiento como de producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper *et al.*, *Science* 314:1565-1568 (2006)). Basándose en los resultados, pueden aplicarse rondas posteriores de modelado, modificación por ingeniería genética y evolución adaptativa al productor de 1,3-butanodiol para aumentar adicionalmente la producción.

Para la producción a gran escala de 1,3-butanodiol se cultiva el organismo que contiene la ruta de alanina anterior en un fermentador usando un medio conocido en la técnica para soportar el crecimiento del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan de una manera o bien discontinua, semicontinua o continua. Las condiciones anaerobias se mantienen rociando en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellando el recipiente de cultivo (por ejemplo, pueden sellarse los frascos con un tapón y una tapa de rosca). También pueden utilizarse condiciones microaerobias proporcionando un pequeño orificio para lograr una aireación limitada. El pH del medio se mantiene a un pH de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. La velocidad de crecimiento se determina midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la velocidad de captación de glucosa monitorizando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo. Subproductos tales como alcoholes no deseados, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu) con una columna HPX-087 (BioRad), usando un detector de índice de reflexión para glucosa y alcoholes, y un detector UV para ácidos orgánicos, Lin *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 775-779 (2005).

Ejemplo II

Síntesis de 1,3-BDO usando acetoacetyl-CoA como producto intermedio

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano que puede producir 1,3-butanodiol usando

acetoacetil-CoA como precursor (etapas G, H y I en la figura 2).

Se usa *Escherichia coli* como organismo diana para modificar por ingeniería genética la ruta a través de las etapas G (conversión de acetoacetil-CoA en 3-hidroxi butiril-CoA), H (conversión de 3-hidroxi butiril-CoA en 3-hidroxi butiraldehído) e I (conversión de 3-hidroxi butiraldehído en 1,3-butanodiol) en la figura 2. *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo que se produce de manera no natural que puede producir 1,3-butanodiol. *E. coli* es propenso a manipulación genética y se sabe que puede producir diversos productos, como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, eficazmente en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada por ingeniería genética para producir 1,3-butanodiol, se expresan en *E. coli* ácidos nucleicos que codifican para las enzimas utilizadas en la ruta divulgada (etapas G, H y I) tal como se describió anteriormente, usando técnicas de biología molecular bien conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente, 2001; Ausubel citado anteriormente, 1999; Roberts *et al.*, citado anteriormente, 1989). Obsérvese que *E. coli* tiene una tiolasa nativa codificada por *atoB* (número de registro: NP_416728,1) que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA.

Además, se clona *hbd* (NP_349314.1) que codifica para acetoacetil-CoA reductasa (reducción de cetona), en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Se transforma el plásmido en la cepa de *E. coli* MG1655 para expresar la enzima requerida para la formación de 3-hidroxi butiril-CoA por medio de acetoacetil-CoA. También se clonan en el vector pZE13 una aldehído deshidrogenasa (seleccionada de la tabla A a continuación) que convierte 3-hidroxi butiril-CoA en 3-hidroxi butiraldehído, y una alcohol deshidrogenasa (seleccionada de la tabla B a continuación) que reduce adicionalmente 3-hidroxi butiraldehído a 1,3-BDO, bajo el promotor PA1/lacO.

El organismo modificado genéticamente resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente, 2001). La expresión de los genes de la ruta se corrobora usando métodos bien conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, transferencias de tipo Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencia. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman usando ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada por ingeniería genética para producir 1,3-butanodiol se confirma usando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (CGEM) o cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CLEM).

Las cepas microbianas modificadas por ingeniería genética para tener una ruta de síntesis de 1,3-butanodiol funcional se aumentan adicionalmente mediante optimización para lograr una utilización eficaz de la ruta. En resumen, la cepa modificada por ingeniería genética se evalúa para determinar si cualquiera de los genes exógenos se expresan a un nivel limitante de la velocidad. Se aumenta la expresión para cualquier enzima expresada a bajos niveles que pueden limitar el flujo a través de la ruta mediante, por ejemplo, la introducción de números de copias adicionales del gen.

Para generar mejores productores, se utiliza modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. Se usa también modelado para diseñar desactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la utilización de la ruta (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense 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 estadounidense nº 7.127.379). El análisis del modelado permite predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficaz de 1,3-butanodiol. Un método de modelado es el enfoque de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard *et al.*, Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar desactivaciones génicas que dan como resultado colectivamente una mejor producción de 1,3-butanodiol. También puede usarse evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, el producto intermedio acetil-CoA o el producto 1,3-butanodiol. La evolución adaptativa se realiza para mejorar tanto las características de crecimiento como de producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper *et al.*, *Science* 314:1565-1568 (2006)). Basándose en los resultados, pueden aplicarse rondas posteriores de modelado, modificación por ingeniería genética y evolución adaptativa al productor de 1,3-butanodiol para aumentar adicionalmente la producción.

Para la producción a gran escala de 1,3-butanodiol, se cultiva el organismo recombinante en un fermentador usando un medio conocido en la técnica para soportar el crecimiento del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan de una manera o bien discontinua, semicontinua o continua. Las condiciones anaerobias se mantienen rociando en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellando el recipiente de cultivo (por ejemplo, pueden sellarse los frascos con un tapón y una tapa de rosca). También pueden utilizarse condiciones microaerobias proporcionando un pequeño orificio para lograr una aireación limitada. El pH del medio se mantiene a un pH de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. Se determina la velocidad de crecimiento midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la velocidad de captación de glucosa monitorizando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo. Subproductos tales como alcoholes no deseados, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu) con una columna HPX-087(BioRad),

usando un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector UV para ácidos orgánicos (Lin et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 90:775-779 (2005)).

Se sometieron a prueba varias aldehído deshidrogenasas para detectar actividad sobre 3-hidroxiacetaldehído-CoA. Se sometieron a prueba lisados en bruto de bacterias, portando cada cepa uno de los seis genes enumerados en la tabla A a continuación que codifican para una aldehído deshidrogenasa para detectar actividad sobre 3-hidroxiacetaldehído-CoA midiendo la liberación del resto CoA. Los genes que se sometieron a prueba y se encontró que tenían actividad significativa sobre 3-HBCoA codifican para las proteínas con los siguientes números de registro y GI:

Tabla A

<u>Proteína</u>	<u>ID de GenBank</u>	<u>Número de GI</u>	<u>Organismo</u>
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ald</i>	ACL06658.1	218764192	<i>Desulfatibacillum alkenivorans AK-01</i>
<i>ald</i>	YP_001452373	157145054	<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895
<i>pduP</i>	NP_460996.1	16765381	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium
<i>pduP</i>	ABJ64680.1	116099531	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
BseIDRAFT_1651	ZP_02169447	163762382	<i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10

Para corregir la actividad de fondo en el lisado, se compararon las actividades medidas con un control negativo sin gen de ALD (vector sólo, "Vo"). La figura 4 muestra la actividad específica de cada uno de los genes sometidos a prueba sobre 3-hidroxiacetaldehído-CoA. Las id de los genes se muestran en el eje x.

Además, también se sometió a prueba *bld* (ID de GenBank: AAP42563.1, número de GI: 31075383) para detectar actividad sobre 3-HBCoA. La siguiente figura 5 muestra la actividad del gen sobre 3-hidroxiacetaldehído-CoA antes y después de diálisis.

Se enumeran a continuación alcohol deshidrogenasas que se sometieron a prueba para detectar actividad sobre 3-hidroxiacetaldehído y demostraron que tenían actividad significativa.

Tabla B

<u>Proteína</u>	<u>ID de GenBank</u>	<u>Número de GI</u>	<u>Organismo</u>
<i>Bdh (Cbei_2181)</i>	YP_001309304	150017050	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>Bdh (Cbei_1722)</i>	YP_001309535.1	150016596	<i>Clostridium beijerinckii</i>
<i>Bdh (Cbei_2421)</i>	YP_001309535.1	150017281	<i>Clostridium beijerinckii</i>

Se usó el siguiente protocolo para demostrar la actividad de alcohol deshidrogenasa (es decir, conversión de 3-hidroxiacetaldehído en 1,3-BDO) y las actividades aldehído y alcohol deshidrogenasa combinadas (es decir, conversión de 3-hidroxiacetaldehído-CoA en 1,3-BDO).

Se transformaron células químicamente competentes con plásmidos que contenían o bien una aldehído deshidrogenasa o bien una alcohol deshidrogenasa (enumeradas en las tablas A y B anteriormente). Se recogieron colonias de las placas y se hicieron crecer en LB más 100 µg/ml de carbenicilina durante la noche, entonces se usaron 0,6 ml para inocular 60 ml de cultivo de cada alcohol deshidrogenasa, o se usaron 1,5 ml para inocular un cultivo de 500 ml de cada aldehído deshidrogenasa. Se hicieron crecer las células a 37°C hasta una D.O. de ~0,7 y se indujeron con IPTG. Se incubaron los cultivos a 30°C durante la expresión de proteínas durante 4 horas. Se dividieron los cultivos celulares en alícuotas de 30 ml, se centrifugaron y se almacenaron los sedimentos celulares a -80°C. Se usó una muestra del cultivo celular para estimar la densidad celular final.

Se examinaron combinaciones de alcohol deshidrogenasas y aldehído deshidrogenasas en un formato de placa de 96 pocillos con 3-hidroxiacetaldehído-CoA como sustrato más un control (sin sustrato). Alternativamente, para someter a prueba la actividad alcohol deshidrogenasas, sólo se añadieron las alcohol deshidrogenasas con y sin el sustrato, 3-hidroxiacetaldehído. Se realizó la preparación de lisados celulares en hielo en la sala fría (4°C). Se usó la densidad celular final para calcular la cantidad de reactivo de lisis celular Bug Buster para cada sedimento celular. Se añadieron lisozima (10 µl) y benzonasa (10 µl) a 35 µl de Bug Buster y se invirtieron suavemente para mezclar. En primer lugar, se añadieron 50 µl de ditiotretitol (disolución madre 100 mM) al sedimento, luego se añadieron al sedimento celular 0,5 ml por D.O. de 1,0 (a 600 nm) del Bug Buster más mezcla de enzimas y se mezcló suavemente para resuspender.

A cada pocillo, se le añadieron 50 µl de MOPS 1 M (pH = 7,5) y 25 µl de mezcla de cofactores (NADH 4 mM y NADPH 4 mM), tanto 100 µl de lisado celular de aldehído deshidrogenasa como 150 µl de lisado celular de alcohol

deshidrogenasa o sólo 150 µl de lisado celular de alcohol deshidrogenasa y se mezcló suavemente. Entonces, se añadió el sustrato relevante a los pocillos. Se resuspendieron 25 mg de 3-hidroxi-butilirilo CoA en 250 µl de agua y se añadieron 5 µl a cada pocillo que sometía a prueba las actividades tanto alcohol como aldehído deshidrogenasa para una concentración final de 1,8 mM. Para someter a prueba sólo la actividad alcohol deshidrogenasa, se añadieron a cada pocillo 50 µl de 3-hidroxi-butilaldehído (preparado mezclando 0,6 ml de acetaldehído en 5 ml de agua más base catalítica (un gránulo de NaOH) Guthrie, J.P. (referencia adjunta)). La concentración final de 3-hidroxi-butilaldehído en cada pocillo era de aproximadamente 50 mM. Se selló la placa de 96 pocillos profundos con un sello de PCR de plástico y se incubó a 30°C agitando durante la noche (18 horas en total). Debido a que la proteína y los residuos celulares forman precipitados durante el periodo de incubación, se centrifugaron las placas durante 10 min a 4500 xg, y se filtró el sobrenadante a través de una placa filtrante de 96 pocillos Whatman (0,45 µm) antes del análisis mediante CL-EM. Se analizaron las muestras para detectar la formación de 1,3-butanodiol.

La figura 6 muestra concentraciones de 1,3-BDO cuando se añadió 3-hidroxi-butilaldehído como sustrato y en las muestras de control sin sustrato. Se muestran los números de GI para las alcohol deshidrogenasas.

La figura 7 muestra concentraciones de 1,3-BDO cuando se añadió 3-hidroxi-butil-CoA como un sustrato y en las muestras de control sin sustrato. Se muestran los números de GI para las alcohol deshidrogenasas. El número de GI para la aldehído deshidrogenasa sometida a prueba conjuntamente es 163762382.

Ejemplo III de referencia

Síntesis de 1,3-BDO usando 4-hidroxi-butil-CoA como producto intermedio

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano que puede producir 1,3-butanodiol usando 4-hidroxi-butil-CoA como el precursor (etapas A, B y E en la figura 3).

Se usa *Escherichia coli* como organismo diana para modificar por ingeniería genética la ruta a través de las etapas A, B y E en la figura 3. *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo que se produce de manera no natural que puede producir 1,3-butanodiol. *E. coli* es propenso a manipulación genética y se sabe que puede producir diversos productos, como etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico, eficazmente en condiciones anaerobias o microaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada por ingeniería genética para producir 1,3-butanodiol, se expresan en *E. coli* ácidos nucleicos que codifican para las enzimas utilizadas en la ruta divulgada (etapas A, B y E) tal como se describió anteriormente, usando técnicas de biología molecular bien conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente, 2001; Ausubel citado anteriormente, 1999; Roberts *et al.*, citado anteriormente, 1989). Una cepa recombinante que se ha modificado por ingeniería genética para producir cantidades significativas de 4-hidroxi-butil-CoA se ha descrito previamente por los solicitantes (Burk *et al.* (US 20090075351) y se usará para insertar la ruta propuesta para dar 1,3-butanodiol.

Además, se clonan los genes *abfD* (YP_3001396399.1), *crt* (NP_349318.1) y *adhE2* (AAK09379.1) que codifican para las actividades 4-hidroxi-butil-CoA deshidratasa, crotonasa y 3-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de alcohol) respectivamente, en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Se transforma el plásmido en la cepa de *E. coli* recombinante que produce 4-hidroxi-butil-CoA para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la síntesis de 1,3-butanodiol a partir de este metabolito.

El organismo modificado genéticamente resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente, 2001). La expresión de los genes de la ruta se corrobora usando métodos bien conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o la actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, transferencias de tipo Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencia. Las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas se confirman usando ensayos específicos para las actividades individuales. La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada por ingeniería genética para producir 1,3-butanodiol se confirma usando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (CGEM) o cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CLEM).

Las cepas microbianas modificadas por ingeniería genética para tener una ruta de síntesis de 1,3-butanodiol funcional se aumentan adicionalmente mediante optimización para lograr una utilización eficaz de la ruta. En resumen, la cepa modificada por ingeniería genética se evalúa para determinar si cualquiera de los genes exógenos se expresan a un nivel limitante de la velocidad. Se aumenta la expresión para cualquier enzima expresada a bajos niveles que pueden limitar el flujo a través de la ruta mediante, por ejemplo, introducción de números de copias adicionales del gen.

Para generar mejores productores, se utiliza modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. Se usa también modelado para diseñar desactivaciones génicas que optimizan adicionalmente la utilización de la ruta (véanse por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense 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 estadounidense nº 7.127.379). El análisis del modelado permite predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento celular de cambiar el metabolismo hacia una producción más eficaz de 1,3-butanodiol. Un método de modelado es el enfoque de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard *et al.*, *Biotechnol. Bioengineer.* 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar desactivaciones génicas que dan como resultado colectivamente una mejor producción de 1,3-butanodiol. También puede usarse evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, el producto intermedio acetil-CoA o el producto 1,3-butanodiol. La evolución adaptativa se realiza para mejorar tanto las características de crecimiento como de producción (Fong y Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004); Alper *et al.*, *Science* 314:1565-1568 (2006)). Basándose en los resultados, pueden aplicarse rondas posteriores de modelado, modificación por ingeniería genética y evolución adaptativa al productor de 1,3-butanodiol para aumentar adicionalmente la producción.

Para la producción a gran escala de 1,3-butanodiol, se cultiva el organismo recombinante en un fermentador usando un medio conocido en la técnica para soportar el crecimiento del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan de una manera o bien discontinua, semicontinua o continua. Las condiciones anaerobias se mantienen rociando en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellando el recipiente de cultivo (por ejemplo, pueden sellarse los frascos con un tapón y una tapa de rosca). También pueden utilizarse condiciones microaerobias proporcionando un pequeño orificio para lograr una aireación limitada. El pH del medio se mantiene a un pH de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. Se determina la velocidad de crecimiento midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la velocidad de captación de glucosa monitorizando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo. Subproductos tales como alcoholes no deseados, ácidos orgánicos y glucosa residual pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu) con una columna HPX-087(BioRad), usando un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector UV para ácidos orgánicos (Lin *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 90:775-779 (2005)).

TABLA 36 (Ref. FIGURA 1)

Etapa	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de la enzima	Nombre del gen	ID de GenBank ID (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
A	2.3.1.b	D-alanina	2-amino-4-oxopentanoato	AKP tiolasa	ortA	YP_001086914.1	<i>Clostridium difficile</i> 630	D-alanina
							<i>Clostridium difficile</i> 630	D-alanina
							<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYF	D-alanina
							<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYF	D-alanina
							<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514	D-alanina
B	2.6.1.a	2-amino-4-oxopentanoato	2,4-oxopentanoato	2-amino-4-oxopentanoato aminotransferasa u oxidoreductasa (desaminación)	Teth514_1478	YP_001663102.1	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514	D-alanina
							<i>Escherichia coli</i>	L-aspartato
C	4.1.1.a	2,4-dioxopentanoato	3-oxobutanal	2,4-dioxopentanoato descarboxilasa	pdc	P06672.1	<i>Escherichia coli</i>	L-alanina, L-valina
							<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-aspartato
							<i>Bacillus</i> sp. YM-1	D-alanina, D-aminobutanoato, D-aspartato
							<i>Bacillus subtilis</i>	D-alanina, D-aminobutanoato, D-aspartato
							<i>Bacillus cereus</i>	L-leucina, L-valina, 2-aminobutanoato, L-isoleucina
							<i>Thermotoga maritima</i>	L-aspartato
							<i>Zymomonas mobilis</i>	2-cetobutirato
D	1.1.1.a	3-oxo-butiraldehído	4-hidroxi,2-butanona	3-oxobutiraldehído reductasa	alrA	BAB 12273.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2-cetobutirato, 3-hidroxipiruvato
							<i>Pseudomonas putida</i>	2-cetobutirato
							<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	alfa-cetoglutarato
							<i>Acinetobacter</i> sp. cepa M-1	Aldehídos C2-C14

[illegible]

F	4.3.1.a	4-aminobutan-2-ona	butenona	4-aminobutan-2-ona amoniaco liasa	aspA	NP_418562	<i>Escherichia coli</i> K12 subsp. MG1655	L-aspartato
					aspA	P44324.1	<i>Haemophilus influenzae</i>	L-aspartato
					aspA	P07346.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	L-aspartato
					ansB	P26899.1	<i>Bacillus subtilis</i>	L-aspartato
					aspA	P33109.1	<i>Serratia marcescens</i>	L-aspartato
G	4.2.1.a	butenona	4-hidroxi,2-butanona	butanona hidratasa	fumA	P0AC33	<i>Escherichia coli</i> K12	fumarato
					fumC	P05042	<i>Escherichia coli</i> K12	fumarato
					fumC	069294	<i>Campylobacter jejuni</i>	fumarato
					fumC	P84127	<i>Thermus thermophilus</i>	fumarato
					fumH	P14408	<i>Rattus norvegicus</i>	fumarato
					hmd	ABC88407.1	<i>Eubacterium barkeri</i>	2-metilen-glutarato
					dmdA	ABC88408	<i>Eubacterium barkeri</i>	dimetilmaleato
					dmdB	ABC88409.1	<i>Eubacterium barkeri</i>	dimetilmaleato
H	1.1.1.a	4-hidroxi,2-butanona	1,3-butanodiol	4-hidroxi,2-butanona reductasa	bdh	AAA58352.1	<i>Homo sapiens</i>	3-oxobutirato
					adh	AAA23199.2	<i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B593	acetona
					ahaA	AAC25556	<i>Pyrococcus furiosus</i>	2-pentanoal, piruvaldehído
					ldh	YP_725182.1	<i>Ralstonia eutropha</i>	lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato, 2-oxoglutarato
					adh	P14941.1	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> HTD4	acetona
I	4.3.1.a	2-amino-4-oxopentanoato	acetilacrilato	2-amino-4-oxopentanoato amoniaco liasa	aspA	NP_418562	<i>Escherichia coli</i> K12 subsp. MG1655	L-aspartato
					aspA	P44324.1	<i>Haemophilus influenzae</i>	L-aspartato
					aspA	P07346.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	L-aspartato
					ansB	P26899.1	<i>Bacillus subtilis</i>	L-aspartato
					aspA	P33109.1	<i>Serratia marcescens</i>	L-aspartato
J	4.1.1.a	acetilacrilato	butenona	acetilacrilato	xyII	YP_709328.1	<i>Pseudomonas putida</i>	4-oxalocrotonato

				descarboxilasa	<i>xyIII</i>	YP_709353.1	<i>Pseudomonas putida</i>	4-oxalocrotonato
					<i>dmpH</i>	CAA43228.1	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	4-oxalocrotonato
					<i>dmpE</i>	CAA43225.1	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	4-oxalocrotonato
					<i>pdC</i>	U63827	<i>Lactobacillus plantarum</i>	cinnamato derivados y
					<i>pad</i>	AB330293	<i>Klebsiella oxytoca</i>	cinnamato derivados y
K	2.6.1.a	4-aminobutan-2-ona	3-oxobutanol	4-aminobutan-2-ona aminotransferasa u oxidoreductasa (desaminación)	<i>SkyPYD4</i>	ABF58893	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	beta-alanina
					<i>gabT</i>	P22256	<i>Escherichia coli</i>	4-aminobutirato
					<i>Abat</i>	P50554	<i>Rattus norvegicus</i>	3-amino-2-metilpropionato
					<i>UGA1</i>	NP_011533	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4-aminobutirato
					<i>kdd</i>	AAL93966.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3,5-diaminohexanoato
					<i>lysDH</i>	BAB39707	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	L-lisina
L	1.1.1.a	2-amino-4-oxopentanoato	2-amino-4-hidroxipentanoato	2-amino-4-oxopentanoato deshidrogenasa	<i>thrA</i>	AAC73113	<i>Escherichia coli</i>	aspartato semialdehído
					<i>hom6</i>	CAA89671	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	aspartato semialdehído
					<i>hom2</i>	CAD63186	<i>Lactobacillus plantarum</i>	aspartato semialdehído
					<i>akthr2</i>	O81852	<i>Arabidopsis thaliana</i>	aspartato semialdehído
					<i>hom1</i>	CAD64819	<i>Lactobacillus plantarum</i>	aspartato semialdehído
M	2.6.1.a	2-amino-4-hidroxipentanoato	2-oxo-4-hidroxipentanoato	2-amino-4-hidroxipentanoato aminotransferasa u oxidoreductasa (desaminación)	<i>aspC</i>	NP_415448.1	<i>Escherichia coli</i>	L-aspartato
					<i>avlA</i>	YP_026231.1	<i>Escherichia coli</i>	L-alanina, L-valina
					<i>AAT2</i>	P23542.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-aspartato

						<i>dat</i>		<i>Bacillus sp. YM-1</i>	P19938		D-alanina, D-2-aminobutanoato, D-aspartato
						<i>dat</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	O07597		D-alanina, D-2-aminobutanoato, D-aspartato
						<i>ldh</i>		P0A393	<i>Bacillus cereus</i>		L-leucina, L-valina, 2-aminobutanoato, L-isoleucina
						<i>nadX</i>		NP_229443.1	<i>Thermotoga maritima</i>		L-aspartato
N	4.1.1.a	2-oxo-4-hidroxi-pentanoato	3-hidroxibutanal	2-oxo-4-hidroxipentanoato		<i>pdh</i>		P06672.1	<i>Zymomonas mobilis</i>		2-cetobutirato
						<i>pdh1</i>		P06169	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		2-cetobutirato, 3-hidroxipiruvato
						<i>mdhC</i>		P20906.2	<i>Pseudomonas putida</i>		2-cetobutirato
						<i>kgd</i>		O50463.4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		alfa-cetoglutarato
O	1.1.1.a	3-oxo-butiraldehído	3-hidroxi-butiraldehído	3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de cetona)		<i>bdh</i>		AAA58352.1	<i>Homo sapiens</i>		3-oxobutirato
						<i>adh</i>		AAA23199.2	<i>Clostridium beijerinckii</i> B593		acetona
						<i>adhA</i>		AAC25556	<i>Pyrococcus furiosus</i>		2-pentanoal, piruvialdehído
						<i>ldh</i>		YP_725182.1	<i>Ralstonia eutropha</i>		lactato, 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato, 2-oxoglutarato
						<i>adh</i>		P14941.1	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> HTD4		acetona
P	1.1.1.a	3-hidroxi-butiraldehído	1,3-butanodiol	3-hidroxi-butiraldehído reductasa		<i>alrA</i>		BAB 12273.1	<i>Acinetobacter</i> cepa M-1		Aldehídos C2-C14
						<i>ADH2</i>		NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		propionaldehído, isobutiraldehído, 2-butilalaldehído, 3-metilbutiralaldehído, 2-metilbutiralaldehído, fenilacetalddehído
						<i>yqhD</i>		NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>		acetalddehído, malondialdehído,

										propanaldehído, butanaldehído y acroleína
						<i>bdh I</i>	NP_349892.1		<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butiraldehído
						<i>bdh II</i>	NP_349891.1		<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butiraldehído
						<i>4hbd</i>	YP_726053.1		<i>Ralstonia eutropha</i> H16	succinato semialdehído
						<i>ADHI</i>	AAR91477.1		<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG	etanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-propanol
						<i>mmsb</i>	P28811.1		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-hidroxi-butiraldehído, semialdehído malónico, metilmalonato-semialdehído
						<i>P84067</i>	P84067		<i>Thermus thermophilus</i>	metilmalonato-semialdehído

TABLA 37 (Ref: FIGURA 2)

Etapas	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de la enzima	Nombre del gen	ID de GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
A	1.2.1.b	acetoacetil-CoA	3-oxobutiraldehído	acetoacetil-CoA reductasa (formación de aldehído)	<i>Ald</i>	AAT66436	<i>Clostridium beijerinckii</i>	butiril-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	succinil-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	<i>Pseudomonas sp</i>	acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>	malonil-CoA
					<i>mcr</i>	NP_378167	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	malonil-CoA, metilmalonil-CoA
B	1.1.1.a	3-oxobutiraldehído	3-hidroxi-butiraldehído	3-oxobutiraldehído reductasa	<i>bdh</i>	AAA58352.1	<i>Homo sapiens</i>	3-oxobutirato

				(reducción cetona)	de							
						<i>adh</i>		AAA23199.2		<i>Clostridium beijerinckii</i> B593	NRRL	acetona
						<i>adhA</i>		AAC25556		<i>Pyrococcus furiosus</i>		2-pentanol, piruvaldehido
						<i>ldh</i>		YP_725182.1		<i>Ralstonia eutropha</i>		lactato, 2- oxobutirato, 2- oxopentanoato, 2- oxoglutarato
						<i>adh</i>		P14941.1		<i>Thermoanaerobacter brockii</i> HTD4		acetona
C	1.1.1.a	3-hidroxibutiraldehído	1,3-butanodiol	3-hidroxibutiraldehido reductasa		<i>alrA</i>		BAB12273.1		<i>Acinetobacter cepa M-1</i>	sp.	Aldehidos C2-C14
						<i>ADH2</i>		NP_014032.1		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		propionaldehído, isobutiraldehído, 2- butiraldehído, 2- metilbutiraldehído, 3- metilbutiraldehído, 2-fenilacetaldéhido
						<i>yqhD</i>		NP_417484.1		<i>Escherichia coli</i>		acetaldehído, malondialdehído, propanaldehído, butanaldehído y acroleína
						<i>bdh I</i>		NP_349892.1		<i>Clostridium acetobutylicum</i>		butiraldehído
						<i>bdh II</i>		NP_349891.1		<i>Clostridium acetobutylicum</i>		butiraldehído
						<i>4hbd</i>		YP_726053.1		<i>Ralstonia eutropha</i> H16		succinato semialdehído
						<i>ADHI</i>		AAR91477.1		<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG		etanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1- heptanol, 1- hexanol, 1-octanol, 2-propanol
						<i>mmsb</i>		P28811.1		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		3-hidroxi- butiraldehído, semialdehído malónico, metilmalonato-

												semialdehído
												metilmalonato-semialdehído
D	1.1.1.c	acetoacetil-CoA	4-hidroxí, 2-butanona		acetoacetil-CoA reductasa (formación alcohol)	<i>adhE2</i>	P84067	P84067		<i>Thermus thermophilus</i>		butanoil-CoA
						<i>mcr</i>		AAS20429.1		<i>Chloroflexus aurantiacus</i>		malonil-CoA
						<i>FAR</i>		AAD38039.1		<i>Simmondsia chinensis</i>		acil-CoA de cadena larga
E	1.1.1.a	3-oxobutiraldehído	4-hidroxí, 2-butanona		3-oxobutiraldehído reductasa (reducción de aldehído)	<i>alrA</i>		BAB12273.1		<i>Acinetobacter cepa M-1</i>	sp.	Aldehídos C2-C14
						<i>ADH2</i>		NP_014032.1		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		propionaldehído, isobutiraldehído, butiraldehído, 2-metilbutiraldehído, 3-metilbutiraldehído, metilbutiraldehído, 2-fenilacetaldéhid
						<i>yqhD</i>		NP_417484.1		<i>Escherichia coli</i>		acetaldéhid, malondialdehído, propanaldehído, butanaldehído y acroleína
						<i>bdh I</i>		NP_349892.1		<i>Clostridium acetobutylicum</i>		butiraldehído
						<i>bdh II</i>		NP_349891.1		<i>Clostridium acetobutylicum</i>		butiraldehído
						<i>4hbd</i>		YP_726053.1		<i>Ralstonia eutropha</i> H16		succinato semialdehído
						<i>ADH1</i>		AAR91477.1		<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG		etanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-propanol
						<i>mmsb</i>		P28811.1		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		3-hidroxi-butiraldehído, semialdehído malónico,

							P84067													metilmalonato-semialdehído
																				metilmalonato-semialdehído
F	1.1.1.a	4-hidroxi, butanona	2-	1,3-butanodiol	4-hidroxi,2-butanona reductasa		bdh													3-oxobutirato
							adh													acetona
							adhA													2-pentanoal, piruvaldehído
							ldh													lactato, 2- oxobutirato, 2- oxopentanoato, 2- oxoglutarato
							adh													acetona
G	1.1.1.a	acetoacetil-CoA		3-hidroxibutiril-CoA	acetaoacetil reductasa (reducción de cetona)	CoA	hbd													acetoacetil-CoA
							hbd													acetoacetil-CoA
							Hbd2													acetoacetil-CoA
							Hbd1													acetoacetil-CoA
							Msed_1423													3-hidroxibutiril-CoA (sospechado)
							Msed_0399													3-hidroxibutiril-CoA (sospechado)
							Msed_0389													3-hidroxibutiril-CoA (sospechado)
							Msed_1993													3-hidroxibutiril-CoA (sospechado)
							fadB													3-oxoacil-CoA
							fadJ													3-oxoacil-CoA
H	1.2.1.b	3-hidroxibutiril- CoA		3- hidroxibutiraldehído	3-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de aldehído)		Ald													butiril-CoA
							sucD													succinil-CoA
							bphG													acetaldehído, propionaldehído,

											butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído malonil-CoA
											malonil-CoA, metil-malonil-CoA
I	1.1.1.c	3-hidroxi-butiril-CoA	1,3-butanodiol	3-hidroxi-butiril-CoA reductasa (formación de alcohol)							butanoil-CoA
											malonil-CoA
											acil-CoA de cadena larga

TABLA 38 (Ref. FIGURA 3)

Etapas	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de la enzima	Nombre del gen	ID de GenBank ID (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
A	4.2.1.a	4-hidroxi-butiril-CoA	crotonil-CoA	4-hidroxi-butiril-CoA deshidratasa	<i>abfD</i>	YP_001396399.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	4-hidroxi-butiril-CoA
					<i>abfD</i>	P55792	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	4-hidroxi-butiril-CoA
					<i>abfD</i>	YP_001928843	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	4-hidroxi-butiril-CoA
B	4.2.1.a	crotonil-CoA	3-hidroxi-butiril-CoA	crotonasa	<i>crt</i>	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	3-hidroxi-butiril-CoA
					<i>crt1</i>	YP_001393856	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	3-hidroxi-butiril-CoA
					<i>crt</i>	YP_001929291.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	ejemplo basado en similitud de secuencia
					<i>paaA</i>	NP_745427.1	<i>Pseudomonas putida</i>	enoil-CoA, derivado de cis-dihidrodiol de fenilacetil-CoA
					<i>paaB</i>	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>	enoil-CoA, derivado de cis-dihidrodiol de fenilacetil-CoA
					<i>phaA</i>	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	enoil-CoA, derivado de cis-dihidrodiol de fenilacetil-CoA
					<i>phaB</i>	ABF82234.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	enoil-CoA, derivado de cis-dihidrodiol de fenilacetil-CoA

												fenilacetil-CoA
							maoC		NP_415905.1		<i>Escherichia coli</i>	enol-CoA, derivado de cis-dihidrodiol de fenilacetil-CoA
							paaF		NP_415911.1		<i>Escherichia coli</i>	enol-CoA, derivado de cis-dihidrodiol de fenilacetil-CoA
							paaG		NP_415912.1		<i>Escherichia coli</i>	enol-CoA, derivado de cis-dihidrodiol de fenilacetil-CoA
C	1.2.1.b	3-hidroxibutiril-CoA	3-hidroxibutiraldehído	3-hidroxibutiraldehído	3-hidroxibutiraldehído	3-hidroxibutiraldehído	Ald		AAT66436		<i>Clostridium beijerinckii</i>	butiril-CoA
							sucD		NP_904963.1		<i>Porphyromonas gingivalis</i>	succinil-CoA
							bphG		BAA03892.1		<i>Pseudomonas sp</i>	acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído
							Msed_0709		YP_001190808.1		<i>Metallosphaera sedula</i>	malonil-CoA
							mcr		NP_378167		<i>Sulfolobus tokodaii</i>	malonil-CoA, metilmalonil-CoA
D	1.1.1.a	3-hidroxibutiraldehído	1,3-butanodiol	3-hidroxibutiraldehído	3-hidroxibutiraldehído	3-hidroxibutiraldehído	alrA		BAB12273.1		<i>Acinetobacter cepa M-1</i>	Aldehídos C2-C14
							ADH2		NP_014032.1		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	propionaldehído, isobutiraldehído, butiraldehído, 2-metilbutiraldehído, 3-metilbutiraldehído, 2-fenilacetaldelido
							yqhD		NP_417484.1		<i>Escherichia coli</i>	acetaldehído, malondialdehído, propanaldehído, butanaldehído y acroleína
							bdh I		NP_349892.1		<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butiraldehído
							bdh II		NP_349891.1		<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butiraldehído
							4hbd		YP_726053.1		<i>Ralstonia eutropha</i> H16	succinato semialdehído

										AAR91477.1	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG	etanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-propanol
										P28811.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-hidroxiubutiraldehído, semialdehído malónico, metilmalonato-semialdehído
E	1.1.1.c	3-hidroxibutilil-CoA	1,3-butanodiol	3-hidroxibutilil-CoA reductasa (formación de alcohol)		P84067	P84067	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanolil-CoA	metilmalonato-semialdehído	
						mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>		malonil-CoA		
						FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>		acil-CoA de cadena larga		

Lista de secuencias

<110> GENOMATICA, INC.

5 <120> ORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN DE 1,3-BUTANODIOL

<130> 066662-0298

<140> Documento PCT/US2010/033300

10 <141> 30-04-2010

<150> Documento 61/174.473

<151> 30-04-2009

15 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 20

<212> PRT

<213> *Euglena gracilis*

<400> 1

25 Met Thr Tyr Lys Ala Pro Val Lys Asp Val Lys Phe Leu Leu Asp Lys

1 5 10 15

Val Phe Lys Val

20

REIVINDICACIONES

1. Organismo microbiano que se produce de manera no natural que tiene una ruta de 1,3-butanodiol (1,3-BDO), en el que dicho organismo microbiano comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 3-hidroxi-butiril-CoA reductasa (formación de aldehído) expresada en una cantidad suficiente para producir 1,3-BDO.
2. Organismo microbiano que se produce de manera no natural según la reivindicación 1, en el que dicha 3-hidroxi-butiril-CoA reductasa (formación de aldehído) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *acr1*, *sucD*, *bphG*, *bld*, *adhE*, *Msed_0709*, *mcr*, *asd-2*, *Saci_2370*, *Ald* y *eutE*.
3. Organismo microbiano que se produce de manera no natural según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una 3-hidroxi-butiraldehído reductasa.
4. Organismo microbiano que se produce de manera no natural según la reivindicación 3, en el que dicha 3-hidroxi-butiraldehído reductasa está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *alrA*, *ADH2*, *yqhD*, *bdh I*, *bdh II*, *adhA*, *4hbd*, *adhI*, *P84067*, *mmsb*, *dhat* y *3hidh*.
5. Organismo microbiano que se produce de manera no natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una acetoacetil-CoA reductasa (reducción de cetona).
6. Organismo microbiano que se produce de manera no natural según la reivindicación 5, en el que dicha acetoacetil-CoA reductasa (reducción de cetona) está codificada por uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *thrA*, *akthr2*, *hom6*, *hom1*, *hom2*, *fadB*, *fadJ*, *Hbd2*, *Hbd1*, *hbd*, *HSD17B10*, *phbB*, *phaB*, *Msed_1423*, *Msed_0399*, *Msed_0389*, *Msed_1993*, *adh*, *adhA*, *adh-A*, *mdh*, *ldhA*, *ldh* y *bdh*.
7. Organismo microbiano que se produce de manera no natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho organismo microbiano comprende dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos exógenos, que codifican cada uno para una enzima de la ruta de 1,3-BDO.
8. Organismo microbiano que se produce de manera no natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho organismo microbiano que se produce de manera no natural está en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.
9. Organismo microbiano que se produce de manera no natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho al menos un ácido nucleico exógeno es un ácido nucleico heterólogo.
10. Método para producir 1,3-BDO, que comprende cultivar un organismo microbiano que se produce de manera no natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-BDO.
11. Uso del organismo microbiano que se produce de manera no natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para producir 1,3-BDO, que comprende cultivar el organismo microbiano en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,3-BDO.
12. Método según la reivindicación 10 o uso según la reivindicación 11, que comprende además separar 1,3-BDO de otros componentes en el cultivo.
13. Método o uso según la reivindicación 12, en el que la separación comprende extracción, extracción líquido-líquido continua, pervaporación, filtración con membrana, separación con membrana, ósmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, filtración extractiva, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de absorción o ultrafiltración.
14. Método o uso según la reivindicación 12 ó 13, en el que la separación comprende destilación.

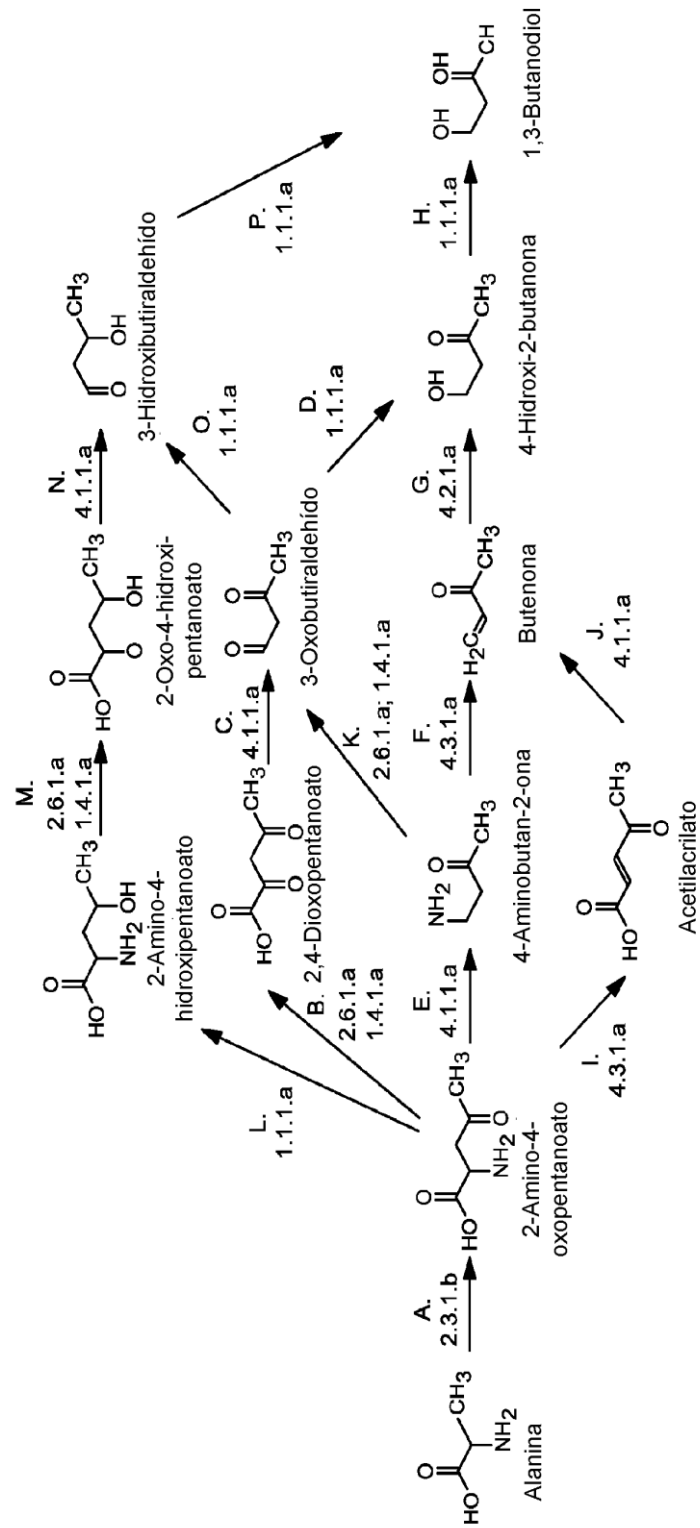


FIG. 1

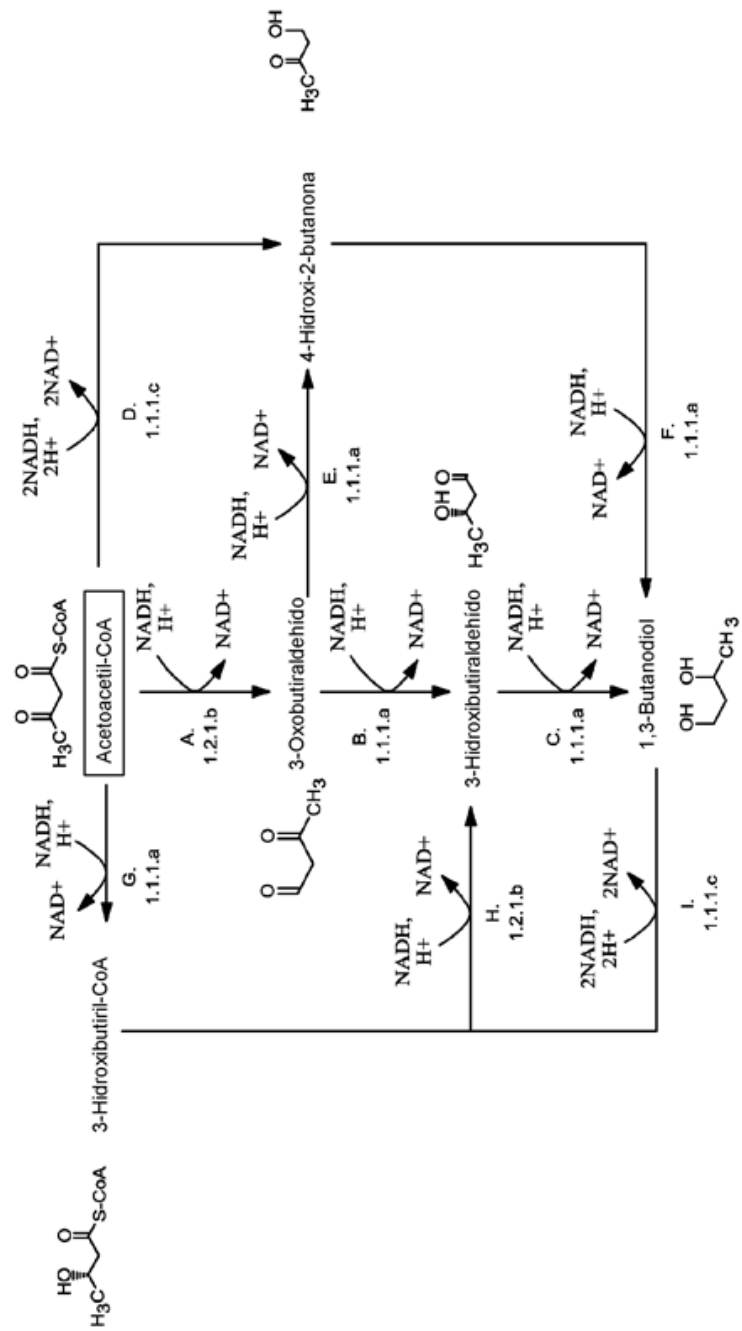
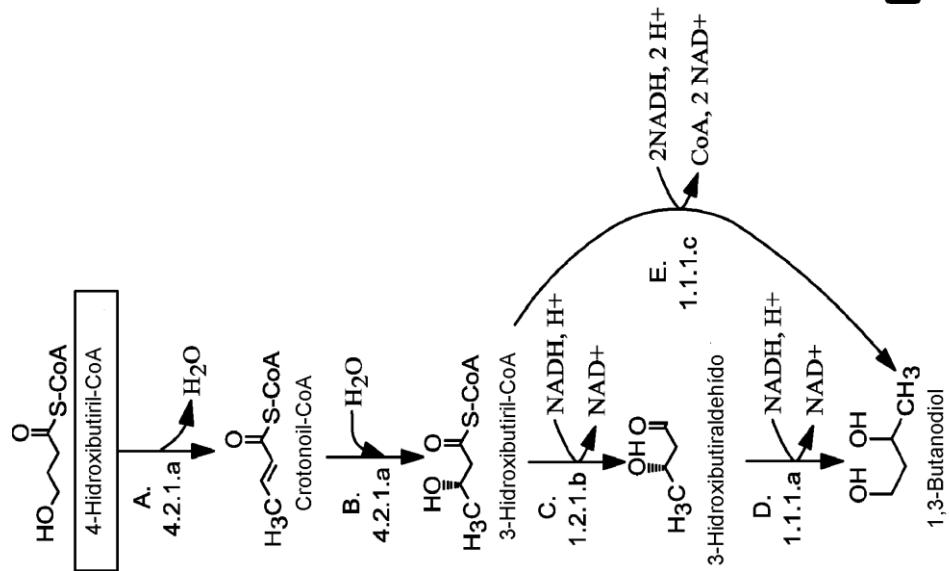


FIG. 2

**FIG. 3**

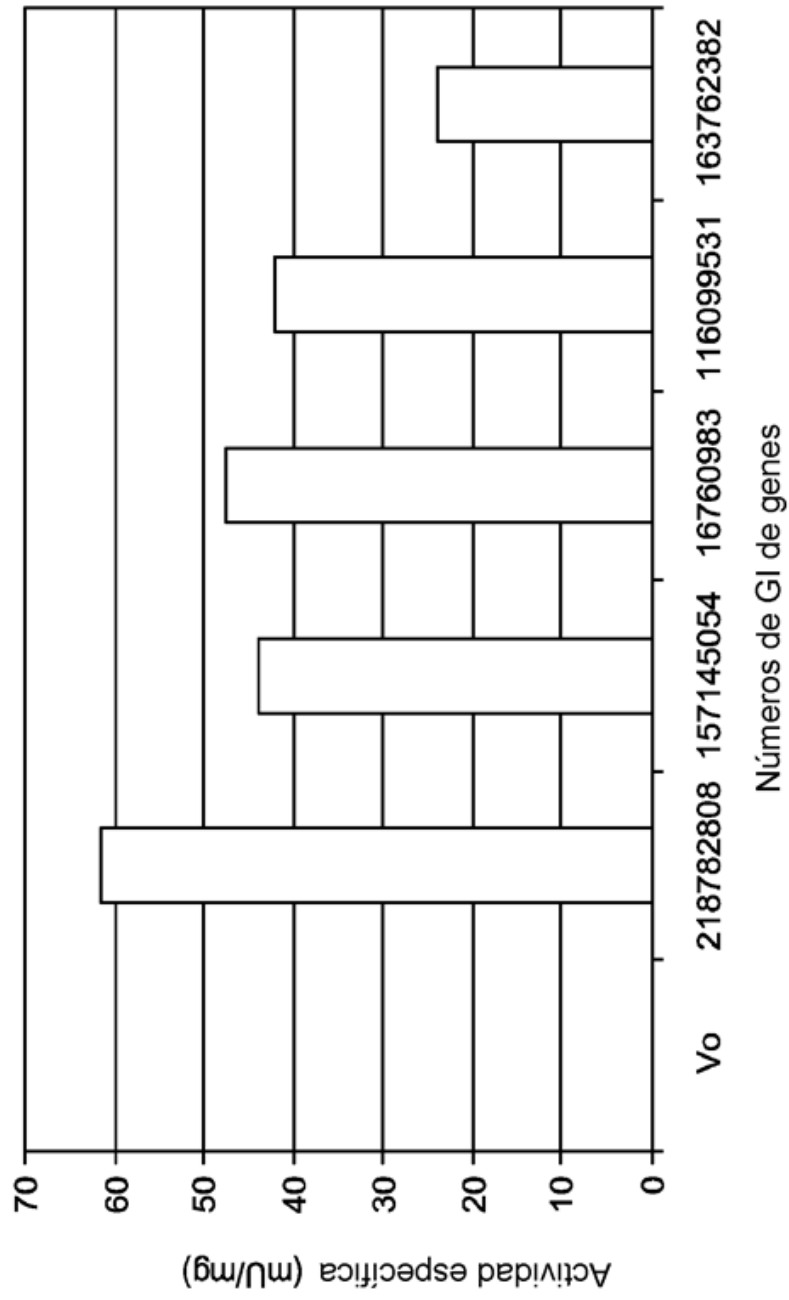


FIG. 4

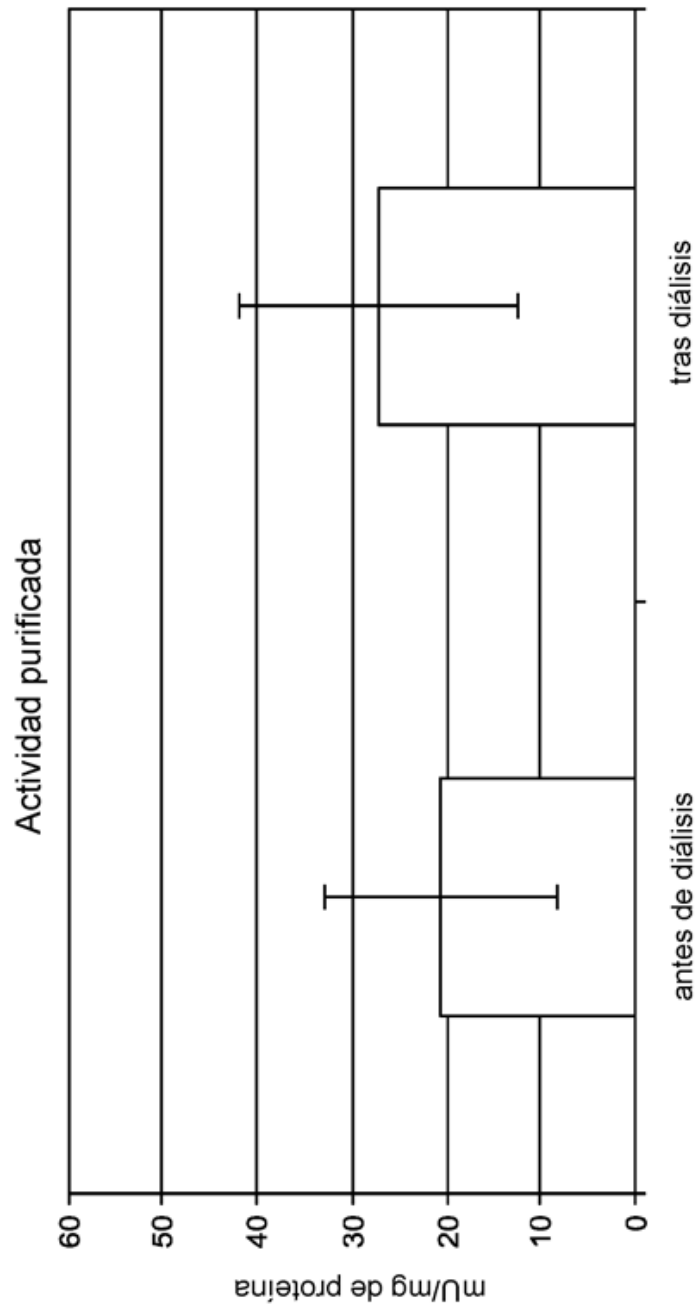


FIG. 5

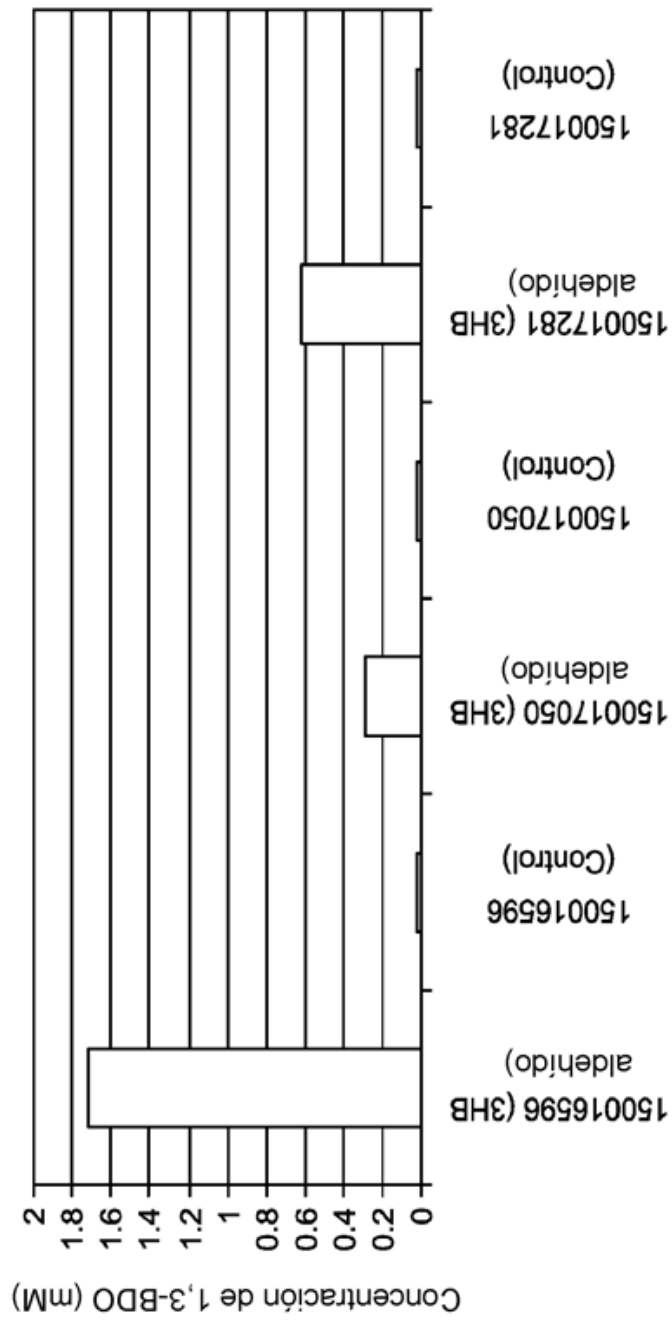


FIG. 6

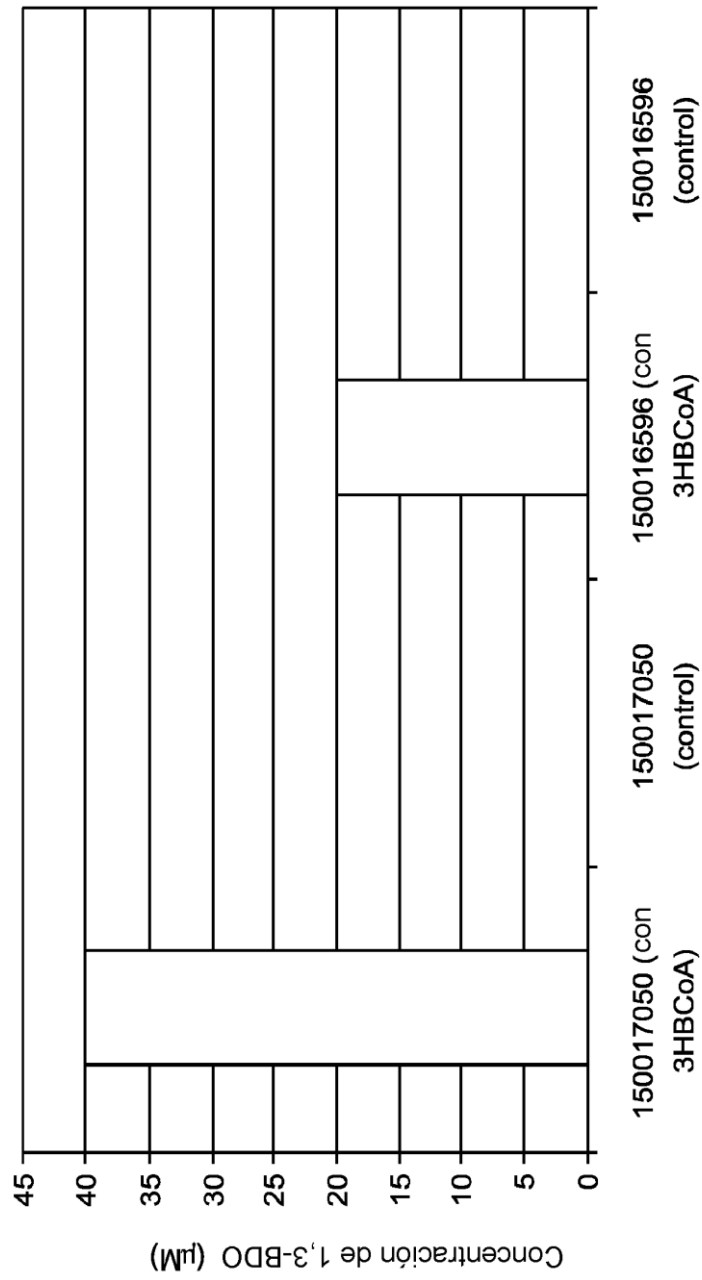


FIG. 7