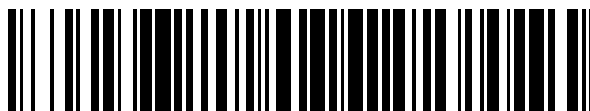


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 905**

51 Int. Cl.:

C12P 7/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2010** **PCT/US2010/037544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010** **WO10141920**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010** **E 10784212 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** **EP 2438178**

54 Título: **Microorganismos para la producción de 1,4-butanodiol y métodos relacionados**

30 Prioridad:

04.06.2009 US 184311 P

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

11.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

VAN DIEN, STEPHEN J.;
BURGARD, ANTHONY P.;
HASELBECK, ROBERT;
PUJOL-BAXLEY, CATHERINE J.;
NIU, WEI;
TRAWICK, JOHN D.;
YIM, HARRY;
BURK, MARK J.;
OSTERHOUT, ROBIN E. y
SUN, JUN

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 680 905 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

Microorganismos para la producción de 1,4-butanodiol y métodos relacionados

5 Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

40 Sumario de la invención

La invención proporciona organismos microbianos que no se producen de manera natural que contienen una ruta de 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO y optimizada adicionalmente para la expresión de BDO. La invención proporciona adicionalmente métodos de uso de tales organismos microbianos para producir BDO.

Breve descripción de los dibujos

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

La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra la biosíntesis de homoserina en *E. coli*.

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

combinación de plásmidos usada: 1, pZE13-0004-0035 y pZA33-0036; 2, pZE13-0004-0035 y pZA33-0010n; 3, pZ13-0004-0008 y pZA33-0036; 4, pZ13-0004-0008 y pZA33-0010n; 5, vectores de control pZE13 y pZA33.

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

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

La figura 6 muestra el espectro de masas de 4-HB y BDO producidos mediante MG1655 lacI^Q pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036 que se hizo crecer en medio mínimo M9 suplementado con glucosa sin marcar 4 g/l (a, c, e y g), glucosa marcada uniformemente con ^{13}C (b, d, f y h). (a) y (b), fragmento característico de masa 116 de BDO derivatizado, que contiene 2 átomos de carbono; (c) y (d), fragmento característico de masa 177 de BDO derivatizado, que contiene 1 átomo de carbono; (e) y (f), fragmento característico de masa 117 de 4-HB derivatizado, que contiene 2 átomos de carbono; (g) y (h), fragmento característico de masa 233 de 4-HB derivatizado, que contiene 4 átomos de carbono.

La figura 7 es un diagrama de flujo de procedimiento esquemático de bioprocedimientos para la producción de γ -butirolactona. El panel (a) ilustra la fermentación de alimentación discontinua con separación discontinua y el panel (b) ilustra la fermentación de alimentación discontinua con separación continua.

Las figuras 8A y 8B muestran rutas de 1,4-butanodiol (BDO) a modo de ejemplo. La figura 8A muestra rutas de BDO a partir de succinil-CoA. La figura 8B muestra rutas de BDO a partir de alfa-cetoglutarato.

Las figuras 9A-9C muestran rutas de BDO a modo de ejemplo. Las figuras 9A y 9B muestran rutas a partir de 4-aminobutirato. La figura 9C muestra una ruta de acetoacetil-CoA a 4-aminobutirato.

La figura 10 muestra rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de alfa-cetoglutarato.

La figura 11 muestra rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de glutamato.

La figura 12 muestra rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de acetoacetil-CoA.

La figura 13 muestra rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de homoserina.

Las figuras 14 muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de succinil-CoA sintetasa de *E. coli*. La figura 14A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) del operón *sucCD* de *E. coli*. Las figuras 14B (SEQ ID NO:) y 14C (SEQ ID NO:) muestran las secuencias de aminoácidos de las subunidades de succinil-CoA sintetasa codificadas por el operón *sucCD*.

La figura 15 muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de alfa-cetoglutarato descarboxilasa de *Mycobacterium bovis*. La figura 15A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) del gen *sucA* de *Mycobacterium bovis*. La figura 15B muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:) de alfa-cetoglutarato descarboxilasa de *M. bovis*.

La figura 16 muestra la biosíntesis en *E. coli* de 4-hidroxibutirato a partir de glucosa en medio mínimo a través de alfa-cetoglutarato en condiciones anaerobias (microaerobias). La cepa huésped es ECKh-401. Los experimentos se marcan basándose en los genes de la ruta aguas arriba presentes en el plásmido pZA33 de la siguiente manera: 1) 4hbd-*sucA*; 2) *sucCD-sucD-4hbd*; 3) *sucCD-sucD-4hbd-sucA*.

La figura 17 muestra la biosíntesis en *E. coli* de 4-hidroxibutirato a partir de glucosa en medio mínimo a través de succinato y alfa-cetoglutarato. La cepa huésped es MG1655 de tipo natural. Los experimentos se marcan basándose en los genes presentes en los plásmidos pZE13 y pZA33 de la siguiente manera: 1) vectores de control vacíos; 2) pZE13, pZA33-4hbd vacíos; 3) pZE13-*sucA*, pZA33-4hbd.

La figura 18A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) de succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA (*sucD*) de *Porphyromonas gingivalis*, y la figura 18B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO:).

La figura 19A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) de 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (4hbd) de *Porphyromonas gingivalis*, y la figura 19B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO:).

La figura 20A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) de 4-hidroxibutirato CoA transferasa (cat2) de *Porphyromonas gingivalis*, y la figura 20B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO:).

La figura 21A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) de fosfotransbutirilasa (ptb) de *Clostridium acetobutylicum*, y la figura 21B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO:).

La figura 22A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) de butirato cinasa (buk1) de *Clostridium acetobutylicum*, y la figura 22B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO:).

La figura 23 muestra secuencias de nucleótidos alternativas para *C. acetobutylicum* 020 (fosfotransbutirilasa) con codones alterados para codones de *E. coli* más prevalentes con respecto a la secuencia nativa de *C. acetobutylicum*. Las figuras 23A-23D (020A-020D, SEQ ID NO:, respectivamente) contienen secuencias con números crecientes de codones de *E. coli* poco frecuentes sustituidos por codones más prevalentes (A<B<C<D).

La figura 24 muestra secuencias de nucleótidos alternativas para *C. acetobutylicum* 021 (butirato cinasa) con codones alterados para codones de *E. coli* más prevalentes con respecto a la secuencia nativa de *C. acetobutylicum*. Las figuras 24A-24D (021A-021B, SEQ ID NO:, respectivamente) contienen secuencias con números crecientes de codones de *E. coli* poco frecuentes sustituidos por codones más prevalentes (A<B<C<D).

La figura 25 muestra la expresión mejorada de butirato cinasa (BK) y fosfotransbutirilasa (PTB) con codones optimizados para la expresión en *E. coli*. La figura 25A muestra electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) teñida para detectar proteínas con azul de Coomassie; carril 1, vector de control sin inserto; carril 2, expresión de secuencias nativas de *C. acetobutylicum* en *E. coli*; carril 3, expresión de PTB-BK con codones optimizados de 020B-021B; carril 4, expresión de PTB-BK con codones optimizados de 020C-021C. Se muestran las posiciones de BK y PTB. La figura 25B muestra las actividades BK y PTB de secuencia de *C. acetobutylicum* nativa (2021n) en comparación con 020B-021B (2021B) y 020C-021C (2021C) con codones optimizados.

La figura 26 muestra la producción de BDO y gamma-butilactona (GBL) en diversas cepas que expresan enzimas productoras de BDO: Cat2 (034); 2021n; 2021B; 2021C.

La figura 27A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) del gen ald de *Clostridium beijerinckii* nativo (025n), y la figura 27B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO:).

Las figuras 28A-28D muestran secuencias génicas alternativas para el gen ald de *Clostridium beijerinckii* (025A-025D, SEQ ID NO:, respectivamente), en las que números crecientes de codones poco frecuentes se sustituyen por codones más prevalentes (A<B<C<D).

La figura 29 muestra la expresión del gen ald de *C. beijerinckii* nativo y variantes con condones optimizados; sin ins (control sin inserto), 025n, 025A, 025B, 025C, 025D.

La figura 30 muestra la producción de BDO o BDO y etanol en diversas cepas. La figura 30 muestra la producción de BDO en cepas que contienen el gen ald de *C. beijerinckii* nativo (025n) o variantes con codones optimizados para la expresión en *E. coli* (025A-025D). La figura 30B muestra la producción de etanol y BDO en cepas que expresan la enzima AdhE2 de *C. acetobutylicum* (002C) en comparación con la variante con codones optimizados 025B. El tercer conjunto muestra la expresión de sucD de *P. gingivalis* (035). En todos los casos, también se expresa Cat2 de *P. gingivalis* (034).

La figura 31A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) del gen adh1 de *Geobacillus thermoglucosidasius*, y la figura 31B muestra la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO:).

La figura 32A muestra la expresión del gen adh1 de *Geobacillus thermoglucosidasius* en *E. coli*. Se analizaron o bien lisados de células completas o bien sobrenadantes mediante SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie para detectar plásmido sin inserto, plásmido con insertos 083 (N-bencil-3-pirrolidinol deshidrogenasa de *Geotrichum capitatum*) y plásmido con 084 (adh1 de *Geobacillus thermoglucosidasius*). La figura 32B muestra la actividad de 084 con butiraldehído (rombos) o 4-hidroxibutiraldehído (cuadrados) como sustratos.

La figura 33 muestra la producción de BDO en diversas cepas: plásmido sin inserto; 025B, 025B-026n; 025B-026A; 025B-026B; 025B-026C; 025B-050; 025B-052; 025B-053; 025B-055; 025B-057; 025B-058; 025B-071; 025B-083; 025B-084; PTSIacO-025B; PTSIacO-025B-026n.

La figura 34 muestra un mapa de plásmido para el vector pRE119-V2.

La figura 35 muestra la secuencia de la región ECKh-138 que abarca los genes aceF y lpdA. El gen lpdA de *K. pneumonia* está subrayado, y el codón cambiado en el mutante Glu354Lys está sombreado.

La figura 36 muestra la comparación de secuencias de proteína del lpdA de *E. coli* nativo y el lpdA de *K. pneumonia* mutante.

La figura 37 muestra la producción de 4-hidroxibutirato (barras a la izquierda) y BDO (barras a la derecha) en las cepas AB3, MG1655 Δ ldhA y ECKh-138. Todas las cepas expresaron sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis* en el plásmido de número de copias medio pZA33, y Cat2 de *P. gingivalis*, AdhE2 de *C. acetobutylicum* en el plásmido de número de copias alto pZE13.

La figura 38 muestra la secuencia de nucleótidos del extremo 5' del gen aceE fusionado al promotor pflB-p6 y sitio de unión a ribosoma (RBS). La secuencia en cursiva en 5' muestra el inicio del gen aroP, que se transcribe en el sentido opuesto al operón pdh. La secuencia en cursiva en 3' muestra el inicio del gen aceE. En mayúsculas: RBS de pflB. Subrayado: sitio de unión a FNR. En negrita: secuencia de promotor pflB-p6.

La figura 39 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:) en la región aceF-lpdA en la cepa ECKh-456.

La figura 40 muestra la producción de 4-hidroxibutirato, BDO y piruvato (barras de izquierda a derecha, respectivamente) para cada una de las cepas ECKh-439, ECKh-455 y ECKh-456.

La figura 41A muestra un esquema de los sitios de recombinación para la delección del gen mdh.

La figura 41B muestra la secuencia del producto de PCR de la amplificación del gen de resistencia a cloranfenicol (CAT) flanqueado por sitios de FRT y regiones de homología del gen mdh del plásmido pKD3.

La figura 42 muestra la secuencia de la región delecionada de arcA en la cepa ECKh-401.

La figura 43 muestra la secuencia de la región que abarca un gen gltA mutado de la cepa ECKh-422.

La figura 44 muestra la actividad citrato sintasa del producto génico de gltA de tipo natural y el mutante R163L. El ensayo se realizó en ausencia (rombos) o presencia de NADH 0,4 mM (cuadrados).

La figura 45 muestra la producción de 4-hidroxibutirato (barras a la izquierda) y BDO (barras a la derecha) en las cepas ECKh-401 y ECKh-422, expresando ambas genes para la ruta de BDO completa en plásmidos.

La figura 46 muestra flujos metabólicos centrales e intervalos de confianza del 95% asociados a partir de experimentos de marcaje metabólico. Los valores son flujos molares normalizados para una tasa de captación de glucosa de 1 mmol/h. El resultado indica que el flujo de carbono se dirige a través de citrato sintasa en el sentido oxidativo y que la mayor parte del carbono entra en la ruta de BDO en lugar de completar el ciclo de TCA.

La figura 47 muestra la formación de producto extracelular para las cepas ECKh-138 y ECKh-422, expresando ambas la ruta de BDO completa en plásmidos. Los productos medidos fueron acetato (Ace), piruvato (Pyr), 4-hidroxibutirato (4HB), 1,4-butanodiol (BDO), etanol (EtOH) y otros productos, que incluyen gamma-butirolactona (GBL), succinato y lactato.

La figura 48 muestra la secuencia de la región tras la sustitución de PEP carboxilasa (ppc) por fosfoenolpiruvato carboxicinasas de *H. influenzae* (pepck). La región codificante de pepck está subrayada.

La figura 49 muestra el crecimiento de cepas pepCK evolucionadas que se hacen crecer en medio mínimo que contiene NaHCO_3 50 mM.

La figura 50 muestra la formación de producto en la cepa ECKh-453 que expresa Cat2 de *P. gingivalis* y Ald de *C. beijerinckii* en el plásmido pZS*13. Los productos medidos fueron 1,4-butanodiol (BDO), piruvato, 4-hidroxibutirato (4HB), acetato, γ -butirolactona (GBL) y etanol.

La figura 51 muestra la producción de BDO de dos cepas, ECKh-453 y ECKh-432. Ambas contienen el plásmido pZS*13 que expresa Cat2 de *P. gingivalis* y Ald de *C. beijerinckii*. Se hicieron crecer los cultivos en condiciones microaerobias, con los recipientes perforados con agujas de calibre 27 ó 18, tal como se indica.

La figura 52 muestra la secuencia de nucleótidos del ADN genómico de la cepa ECKh-426 en la región de inserción de un fragmento de ADN policistrónico que contiene un promotor, gen sucCD, gen sucD, gen 4hbd y una secuencia de terminador.

La figura 53 muestra la secuencia de nucleótidos de la región cromosómica de la cepa ECKh-432 en la región de inserción de una secuencia policistrónica que contiene un promotor, gen sucA, gen 4hbd de *C. kluyveri* y una

secuencia de terminador.

La figura 54 muestra la síntesis de BDO a partir de glucosa en medio mínimo en la cepa ECKh-432 que tiene genes codificantes de la ruta de BDO aguas arriba integrados en el cromosoma y que contiene un plásmido que alberga genes de la ruta de BDO aguas abajo.

La figura 55 muestra un producto de PCR que contiene los genes de utilización de sacarosa distintos de fosfotransferasa (distintos de PTS) flanqueados por regiones de homología a la región de *rrnC*.

La figura 56 muestra un diagrama esquemático del sitio de integraciones en el operón *rrnC*.

La figura 57 muestra la concentración de producto promedio, normalizada para la DO600 de cultivo, tras 48 horas de crecimiento de la cepa ECKh-432 que se hace crecer en glucosa y la cepa ECKh-463 que se hace crecer en sacarosa. Ambas contienen el plásmido pZS*13 que expresa *Cat2* de *P. gingivalis* y *Ald* de *C. beijerinckii*. Los datos son para 6 cultivos repetidos de cada cepa. Los productos medidos fueron 1,4-butanodiol (BDO), 4-hidroxibutirato (4HB), γ -butirolactona (GBL), piruvato (PYR) y acetato (ACE) (barras de izquierda a derecha, respectivamente).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al diseño y a la producción de células y organismos que tienen capacidades de producción biosintética para 1,4-butanodiol (BDO). La invención se refiere, en particular, al diseño de organismos microbianos capaces de producir BDO mediante la introducción de uno o más ácidos nucleicos que codifican para una enzima de la ruta de BDO. Las realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones.

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

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

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

En otras divulgaciones específicas, se construyeron organismos microbianos para expresar una ruta biosintética de 4-HB que codifica para las etapas enzimáticas desde succinato hasta 4-HB y hasta 4-HB-CoA. La expresión conjunta de succinato coenzima A transferasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxibutirato deshidrogenasa dependiente de NAD y 4-hidroxibutirato coenzima A transferasa en un organismo microbiano huésped dio como resultado una producción significativa de 4-HB en comparación con organismos microbianos huésped que carecían de una ruta biosintética de 4-HB. En una divulgación específica adicional, se generaron organismos microbianos productores de 4-HB que usaron α -cetoglutarato como sustrato introduciendo ácidos nucleicos que codificaban para α -cetoglutarato descarboxilasa y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa dependiente de NAD.

En otra divulgación específica, se construyeron organismos microbianos que contenían una ruta biosintética de 1,4-butanodiol (BDO) que biosintetizaban BDO cuando se cultivaban en presencia de 4-HB. La ruta biosintética de BDO consistía o bien en un ácido nucleico que codificaba para una aldehído/alcohol deshidrogenasa multifuncional o bien

ácidos nucleicos que codificaban para una aldehído deshidrogenasa y una alcohol deshidrogenasa. Para soportar el crecimiento sobre sustratos de 4-HB, estos organismos microbianos productores de BDO también expresaban 4-hidroxi-
 5 butirato CoA transferasa o 4-butilato cinasa junto con fosfotranshidroxi-
 butirilasa. En aún una realización específica adicional, se generaron organismos microbianos que sintetizaban BDO mediante expresión exógena de
 ácidos nucleicos que codificaban para una ruta biosintética de 4-HB funcional y una ruta biosintética de BDO
 funcional. La ruta biosintética de 4-HB consistía en succinato coenzima A transferasa, semialdehído succínico
 deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxi-
 10 butirato deshidrogenasa dependiente de NAD y 4-hidroxi-
 butirato coenzima A transferasa. La ruta de BDO consistía en una aldehído/alcohol deshidrogenasa multifuncional. En el
 presente documento se describen además rutas adicionales para la producción de BDO (véanse las figuras 8-13).

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “que no se produce de manera natural”,
 cuando se usa con referencia a un microorganismo u organismo microbiano de la invención, signifique que el
 organismo microbiano tiene al menos una alteración genética que no se encuentra normalmente en una cepa que se
 produce de manera natural de la especie a la que se hace referencia, incluyendo cepas de tipo natural de la especie
 15 a la que se hace referencia. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos
 nucleicos expresables que codifican para polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácido nucleico, delecciones de
 ácido nucleico y/u otra alteración funcional del material genético microbiano. Tal modificación incluye, por ejemplo,
 regiones codificantes y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto
 heterólogos como homólogos para la especie a la que se hace referencia. Las modificaciones adicionales incluyen,
 20 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
 biosintética para una familia de compuestos de BDO.

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

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

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

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

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

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

documento incluya cualquiera de las diversas formas de sal del compuesto.

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

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

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

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

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

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

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

Los ortólogos incluyen genes o sus productos génicos codificados que, por ejemplo, mediante evolución, han divergido en cuanto a su estructura o actividad global. Por ejemplo, cuando una especie codifica para un producto

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

En cambio, los parálogos son homólogos relacionados, por ejemplo, mediante duplicación seguida por divergencia evolutiva y tienen funciones similares o comunes, pero no idénticas. Los parálogos pueden originarse o derivarse, por ejemplo, de la misma especie o de una especie diferente. Por ejemplo, la epóxido hidrolasa microsomal (epóxido hidrolasa I) y la epóxido hidrolasa soluble (epóxido hidrolasa II) pueden considerarse parálogos porque representan dos enzimas diferenciadas, que evolucionaron conjuntamente de un ancestro común, que catalizan reacciones diferenciadas y tienen funciones diferenciadas en la misma especie. Los parálogos son proteínas de la misma especie con similitud de secuencia significativa entre sí que sugiere que son homólogos, o relacionadas mediante evolución conjunta a partir de un ancestro común. Los grupos de familias de proteínas parálogas incluyen homólogos de HipA, genes de luciferasa, peptidasas, y otros. Un desplazamiento génico no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituir a una función génica a la que se hace referencia en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, poder realizar sustancialmente la misma función o una similar en la especie de origen en comparación con la función a la que se hace referencia en la especie diferente. Aunque generalmente un desplazamiento génico no ortólogo podrá identificarse como estructuralmente relacionado con un gen conocido que codifica para la función a la que se hace referencia, no obstante genes estructuralmente menos relacionados pero funcionalmente similares y sus correspondientes productos génicos todavía entrarán dentro del significado del término tal como se usa en el presente documento. La similitud funcional requiere, por ejemplo, al menos algo de similitud estructural en el sitio activo o la región de unión de un gen no ortólogo en comparación con un gen que codifica para la función que se busca sustituir. Por tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parálogo o un gen no relacionado.

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

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

Pueden establecerse parámetros a modo de ejemplo para determinar la relación de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, de la siguiente manera. En resumen, pueden realizarse alineaciones de secuencias de aminoácidos usando BLASTP versión 2.0.8 (05 de enero de 1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0 BLOSUM62; apertura de hueco: 11; extensión de hueco: 1; x_disminución: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 3; filtro: activado. Pueden realizarse alineaciones de secuencias de ácido nucleico usando BLASTN versión 2.0.6 (16

de septiembre de 1998) y los siguientes parámetros: Coincidencia: 1; coincidencia errónea: -2; apertura de hueco: 5; extensión de hueco: 2; x_disminución: 50; esperado: 10,0; tamaño de palabra: 11; filtro: desactivado. Los expertos en la técnica sabrán qué modificaciones realizar en los parámetros anteriores para o bien aumentar o bien disminuir la rigurosidad de la comparación, por ejemplo, y determinar la relación de dos o más secuencias.

En el presente documento se divulgan un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural u organismos microbianos incluyendo un organismo microbiano que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) que incluye al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, alfa-cetoglutarato descarboxilasa o glutamato descarboxilasa, en el que el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) monomérico. La 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa también se denomina 4-hidroxi-butilato deshidrogenasa o 4-HB deshidrogenasa. La succinil-CoA sintetasa también se denomina succinil-CoA sintasa o succinil-CoA ligasa.

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

Los biocatalizadores microbianos que no se producen de manera natural u organismos microbianos pueden incluir organismos microbianos que emplean combinaciones de reacciones metabólicas para producir de manera biosintética los compuestos de la invención. Los compuestos biosintetizados pueden producirse de manera intracelular y/o secretarse al medio de cultivo. Los compuestos a modo de ejemplo producidos por los microorganismos que no se producen de manera natural incluyen, por ejemplo, ácido 4-hidroxi-butanoico, 1,4-butanodiol y γ -butirolactona.

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

Se entiende que puede usarse cualquier combinación de enzimas apropiadas de una ruta de BDO siempre que se logre la conversión desde un componente de partida hasta el producto de BDO. Por tanto, se entiende que puede usarse cualquiera de las rutas metabólicas divulgadas en el presente documento y que los expertos en la técnica conocen bien cómo seleccionar enzimas apropiadas para lograr una ruta deseada, tal como se divulga en el presente documento.

En el presente documento se divulga un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA oxidoreductasa (desaminación), 4-aminobutiril-CoA transaminasa o 4-hidroxi-butil-CoA deshidrogenasa (véase el ejemplo VII, tabla 17). La ruta de BDO puede comprender además 4-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxi-butil-CoA reductasa o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Los expertos en la técnica entienden que pueden usarse diversas combinaciones de las rutas, tal como se divulga en el presente documento. Por ejemplo, en un organismo microbiano que no se produce de manera natural, los ácidos nucleicos pueden codificar para 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa o 4-aminobutirato-CoA ligasa; 4-aminobutiril-CoA oxidoreductasa (desaminación) o 4-aminobutiril-CoA transaminasa; y 4-hidroxi-butil-CoA deshidrogenasa. A continuación se describen específicamente otras combinaciones a modo de ejemplo y pueden encontrarse en las figuras 8-13. Por ejemplo, la ruta de BDO puede comprender además 4-hidroxi-butil-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxi-butil-CoA reductasa o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

En el presente documento se divulga adicionalmente un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-aminobutiril-CoA reductasa, 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidoreductasa (desaminación) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa (véase el ejemplo VII y la tabla 18), y puede comprender además 1,4-butanodiol deshidrogenasa. Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa o 4-aminobutirato-CoA ligasa; 4-aminobutiril-CoA reductasa (formación de alcohol); y 4-aminobutan-1-ol oxidoreductasa (desaminación) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa. Además, los ácidos nucleicos pueden codificar

para 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa o 4-aminobutirato-CoA ligasa; 4-aminobutiril-CoA reductasa; 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa; y 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminación) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa.

En el presente documento también se divulga un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO 4-aminobutirato cinasa, 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilante), 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminación), 4-aminobutan-1-ol transaminasa, ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico oxidorreductasa (desaminación), ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico transaminasa, 4-hidroxibutiril-fosfato deshidrogenasa o 4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación) (véase el ejemplo VII y la tabla 19). Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para 4-aminobutirato cinasa; 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación); 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa; y 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminación) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa. Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para 4-aminobutirato cinasa; ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico oxidorreductasa (desaminación) o ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico transaminasa; 4-hidroxibutiril-fosfato deshidrogenasa; y 4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación).

En el presente documento se divulga adicionalmente un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO alfa-cetoglutarato 5-cinasa, semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación), ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa, alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa, alfa-cetoglutaril-CoA ligasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol), ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase el ejemplo VIII y la tabla 20). La ruta de BDO puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA reductasa o 1,4-butanodiol deshidrogenasa. Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para alfa-cetoglutarato 5-cinasa; semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación); ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa. Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para alfa-cetoglutarato 5-cinasa; semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación); ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación). Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa o alfa-cetoglutaril-CoA ligasa; alfa-cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa. En otra realización, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa o alfa-cetoglutaril-CoA ligasa; alfa-cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación). Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa o alfa-cetoglutaril-CoA ligasa; alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa. En aún otra realización, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa o alfa-cetoglutaril-CoA ligasa; alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol); y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación).

En el presente documento se divulga además un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO glutamato CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa, glutamil-CoA ligasa, glutamato 5-cinasa, glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación), glutamil-CoA reductasa, glutamato-5-semialdehído reductasa, glutamil-CoA reductasa (formación de alcohol), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminación), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase el ejemplo IX y la tabla 21). Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para glutamato CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa o glutamil-CoA ligasa; glutamil-CoA reductasa; glutamato-5-semialdehído reductasa; ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminación) o ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación). Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para glutamato 5-cinasa; glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación); glutamato-5-semialdehído reductasa; ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminación) o ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación). En todavía otra realización, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para glutamato CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa o glutamil-CoA ligasa; glutamil-CoA reductasa (formación de alcohol); ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminación) o ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación). En aún otra realización, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para glutamato 5-cinasa; glutamato-5-

semialdehído deshidrogenasa (fosforilación); ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminación) o ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa; y ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación).

En el presente documento también se divulga un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO 3-hidroxiubutiril-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxiubutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA Δ -isomerasa o 4-hidroxiubutiril-CoA deshidratasa (véase el ejemplo X y la tabla 22). Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para 3-hidroxiubutiril-CoA deshidrogenasa; 3-hidroxiubutiril-CoA deshidratasa; vinilacetil-CoA Δ -isomerasa; y 4-hidroxiubutiril-CoA deshidratasa.

En el presente documento se divulga además un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO homoserina desaminasa, homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa, homoserina-CoA ligasa, homoserina-CoA desaminasa, 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA transferasa, 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA hidrolasa, 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA ligasa, 4-hidroxiubut-2-enoato reductasa, 4-hidroxiubutiril-CoA transferasa, 4-hidroxiubutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxiubutiril-CoA ligasa o 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA reductasa (véase el ejemplo XI y la tabla 23). Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para homoserina desaminasa; 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA transferasa, 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA hidrolasa, 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA ligasa; 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA reductasa. Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa u homoserina-CoA ligasa; homoserina-CoA desaminasa; y 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA reductasa. En una realización adicional, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para homoserina desaminasa; 4-hidroxiubut-2-enoato reductasa; y 4-hidroxiubutiril-CoA transferasa, 4-hidroxiubutiril-CoA hidrolasa o 4-hidroxiubutiril-CoA ligasa. Alternativamente, los ácidos nucleicos exógenos pueden codificar para homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa u homoserina-CoA ligasa; homoserina-CoA desaminasa; y 4-hidroxiubut-2-enoil-CoA reductasa.

En el presente documento se divulga además un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BOD, comprendiendo la ruta de BDO succinil-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxiubutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxiubutiril-CoA ligasa, 4-hidroxiubutanal deshidrogenasa (fosforilación) (véase la tabla 15). Una ruta de BDO de este tipo puede comprender además succinil-CoA reductasa, 4-hidroxiubutirato deshidrogenasa, 4-hidroxiubutiril-CoA transferasa, 4-hidroxiubutirato cinasa, fosfotrans-4-hidroxiubutirilasa, 4-hidroxiubutiril-CoA reductasa, 4-hidroxiubutiril-CoA reductasa (formación de alcohol) o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

En el presente documento se divulga adicionalmente un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de BDO que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO glutamato deshidrogenasa, 4-aminobutirato oxidorreductasa (desaminación), 4-aminobutirato transaminasa, glutamato descarboxilasa, 4-hidroxiubutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxiubutiril-CoA ligasa, 4-hidroxiubutanal deshidrogenasa (fosforilación) (véase la tabla 16). Una ruta de BDO de este tipo puede comprender además alfa-cetoglutarato descarboxilasa, 4-hidroxiubutirato deshidrogenasa, 4-hidroxiubutiril-CoA transferasa, 4-hidroxiubutirato cinasa, fosfotrans-4-hidroxiubutirilasa, 4-hidroxiubutiril-CoA reductasa, 4-hidroxiubutiril-CoA reductasa (formación de alcohol) o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Las rutas descritas anteriormente son simplemente a modo de ejemplo. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente rutas apropiadas a partir de las divulgadas en el presente documento para obtener una ruta de BDO adecuada u otra ruta metabólica, según se desee.

La invención proporciona organismos genéticamente modificados que permiten una producción mejorada de BDO aumentando el producto o disminuyendo los subproductos no deseados. Tal como se divulga en el presente documento, la invención proporciona un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO. En una realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar succinil-CoA sintetasa exógena (véase el ejemplo XII). Por ejemplo, la succinil-CoA sintetasa puede codificarse por genes sucCD de *Escherichia coli*.

En otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar alfa-cetoglutarato descarboxilasa exógena (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la alfa-cetoglutarato descarboxilasa puede codificarse por el gen sucA de *Mycobacterium bovis*. En todavía otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar succinato semialdehído deshidrogenasa y 4-hidroxiubutirato deshidrogenasa y opcionalmente 4-hidroxiubutiril-CoA/acetil-CoA transferasa exógenas (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la

succinato semialdehído deshidrogenasa (dependiente de CoA), 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa pueden codificarse por genes de *Porphyromonas gingivalis* W83. En una realización adicional, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar butirato cinasa y fosfotransbutirilasa exógenas (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la butirato cinasa y fosfotransbutirilasa pueden codificarse por genes buk1 y ptb de *Clostridium acetobutylicum*.

En aún otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar 4-hidroxibutiril-CoA reductasa exógena (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la 4-hidroxibutiril-CoA reductasa puede codificarse por el gen ald de *Clostridium beijerinckii*. Adicionalmente, en una realización de la invención, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar 4-hidroxibutanol reductasa exógena (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la 4-hidroxibutanol reductasa puede codificarse por el gen adh1 de *Geobacillus thermoglucosidasius*. En otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar subunidades de piruvato deshidrogenasa exógena (véase el ejemplo XIV). Por ejemplo, la piruvato deshidrogenasa exógena puede ser insensible a NADH. La subunidad de piruvato deshidrogenasa puede codificarse por el gen lpdA de *Klebsiella pneumoniae*. En una realización particular, los genes de subunidades de piruvato deshidrogenasa del organismo microbiano pueden estar bajo el control de un promotor de piruvato-formiato liasa.

En todavía otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para alterar un gen que codifica para un sistema regulador del control respiratorio aerobio (véase el ejemplo XV). Por ejemplo, la alteración puede ser del gen arcA. Un organismo de este tipo puede comprender además la alteración de un gen que codifica para malato deshidrogenasa. En una realización adicional, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar una citrato sintasa insensible a NADH exógena (véase el ejemplo XV). Por ejemplo, la citrato sintasa insensible a NADH puede codificarse por gltA, tal como un mutante R163L de gltA. En todavía otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar fosfoenolpiruvato carboxicinas exógena (véase el ejemplo XVI). Por ejemplo, la fosfoenolpiruvato carboxicinas puede codificarse por un gen de fosfoenolpiruvato carboxicinas de *Haemophilus influenzae*.

Se entiende que cualquiera de varias modificaciones genéticas, tal como se divulgan en el presente documento, pueden usarse solas o en diversas combinaciones de una o más de las modificaciones genéticas divulgadas en el presente documento para aumentar la producción de BDO en un organismo microbiano productor de BDO. En una realización particular, el organismo microbiano puede modificarse genéticamente para incorporar cualquiera y hasta la totalidad de las modificaciones genéticas que conducen a una producción aumentada de BDO. En una realización particular, el organismo microbiano que contiene una ruta de BDO puede modificarse genéticamente para expresar succinil-CoA sintetasa exógena; para expresar alfa-cetoglutarato descarboxilasa exógena; para expresar succinato semialdehído deshidrogenasa y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y opcionalmente 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa exógenas; para expresar butirato cinasa y fosfotransbutirilasa exógenas; para expresar 4-hidroxibutiril-CoA reductasa exógena; y para expresar 4-hidroxibutanol reductasa exógena; para expresar piruvato deshidrogenasa exógena; para alterar un gen que codifica para un sistema regulador del control respiratorio aerobio; para expresar una citrato sintasa insensible a NADH exógena; y para expresar fosfoenolpiruvato carboxicinas exógena. Tales cepas para la producción mejorada se describen en los ejemplos XII-XIX. Por tanto, se entiende que, además de las modificaciones descritas anteriormente, tales cepas pueden incluir adicionalmente otras modificaciones divulgadas en el presente documento. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, delección de lactato deshidrogenasa (ldhA), alcohol deshidrogenasa (adhE) y/o piruvato-formiato liasa (pflB) endógena (véanse los ejemplos XII-XIX y la tabla 28).

Adicionalmente se proporciona un organismo microbiano en el que uno o más genes que codifican para las enzimas expresadas de manera exógena están integrados en el locus fimD del organismo huésped (véase el ejemplo XVII). Por ejemplo, uno o más genes que codifican para una enzima de la ruta de BDO pueden integrarse en el locus fimD para una producción aumentada de BDO. Además, se proporciona un organismo microbiano que expresa un sistema de captación de sacarosa distinto de fosfotransferasa que aumenta la producción de BDO.

Aunque los organismos microbianos genéticamente modificados divulgados en el presente documento se muestran a modo de ejemplo como organismos microbianos que contienen enzimas particulares de la ruta de BDO, se entiende que tales modificaciones pueden incorporarse en cualquier organismo microbiano que tiene una ruta de BDO adecuada para la producción potenciada en presencia de las modificaciones genéticas. Por tanto, los organismos microbianos de la divulgación pueden tener cualquiera de las rutas de BDO divulgadas en el presente documento. Por ejemplo, la ruta de BDO puede comprender 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxibutirato:CoA transferasa, 4-butilato cinasa, fosfotransbutirilasa, alfa-cetoglutarato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o una aldehído/alcohol deshidrogenasa (véase la figura 1). Alternativamente, la ruta de BDO puede comprender 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA oxidoreductasa (desaminación), 4-aminobutiril-CoA transaminasa o 4-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (véase la tabla 17). Una ruta de BDO de este tipo puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA reductasa o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Adicionalmente, la ruta de BDO puede comprender 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa,

4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-aminobutiril-CoA reductasa, 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminación) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa (véase la tabla 18). Además, la ruta de BDO puede comprender 4-aminobutirato cinasa, 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación), 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminación), 4-aminobutan-1-ol transaminasa, ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico oxidorreductasa (desaminación), ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico transaminasa, 4-hidroxibutiril-fosfato deshidrogenasa o 4-hidroxibutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación) (véase la tabla 19). Una ruta de este tipo puede comprender además 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

La ruta de BDO también puede comprender alfa-cetoglutarato 5-cinasa, semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación), ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa, alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa, alfa-cetoglutaril-CoA ligasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol), ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase la tabla 20). Una ruta de BDO de este tipo puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA reductasa o 1,4-butanodiol deshidrogenasa. Adicionalmente, la ruta de BDO puede comprender glutamato CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa, glutamil-CoA ligasa, glutamato 5-cinasa, glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación), glutamil-CoA reductasa, glutamato-5-semialdehído reductasa, glutamil-CoA reductasa (formación de alcohol), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminación), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase la tabla 21). Una ruta de BDO de este tipo puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA reductasa o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

Adicionalmente, la ruta de BDO puede comprender 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxibutiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA Δ -isomerasa o 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa (véase la tabla 22). Además, la ruta de BDO puede comprender homoserina desaminasa, homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa, homoserina-CoA ligasa, homoserina-CoA desaminasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA transferasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA hidrolasa, 4-hidroxibut-2-enoil-CoA ligasa, 4-hidroxibut-2-enoato reductasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa o 4-hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa (véase la tabla 23). Una ruta de BDO de este tipo puede comprender además 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA reductasa o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

La ruta de BDO puede comprender adicionalmente succinil-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa o 4-hidroxibutanol deshidrogenasa (fosforilación) (véase la tabla 15). Una ruta de este tipo puede comprender además succinil-CoA reductasa, 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, 4-hidroxibutirato cinasa, fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, 4-hidroxibutiril-CoA reductasa, 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol) o 1,4-butanodiol deshidrogenasa. Además, la ruta de BDO puede comprender glutamato deshidrogenasa, 4-aminobutirato oxidorreductasa (desaminación), 4-aminobutirato transaminasa, glutamato descarboxilasa, 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxibutiril-CoA ligasa o 4-hidroxibutanol deshidrogenasa (fosforilación) (véase la tabla 16). Una ruta de BDO de este tipo puede comprender además alfa-cetoglutarato descarboxilasa, 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, 4-hidroxibutiril-CoA transferasa, 4-hidroxibutirato cinasa, fosfotrans-4-hidroxibutirilasa, 4-hidroxibutiril-CoA reductasa, 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol) o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

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

La producción de 4-HB por medio de modos biosintéticos usando los organismos microbianos de la divulgación es particularmente útil porque puede producir 4-HB monomérico. Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación y su biosíntesis de 4-HB y la familia de compuestos de BDO también son particularmente útiles porque el producto de 4-HB (1) puede secretarse; (2) puede estar carente de cualquier derivatización tal como coenzima A; (3) evita cambios termodinámicos durante la biosíntesis; (4) permite la biosíntesis directa de BDO, y (5) permite la conversión química espontánea de 4-HB en γ -butirolactona (GBL) en medio de pH ácido. Esta última característica también es particularmente útil para la síntesis química eficaz o la biosíntesis de compuestos de la familia de BDO tales como 1,4-butanodiol y/o tetrahidrofurano (THF), por ejemplo.

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

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

En el presente documento se muestran a modo de ejemplo cinco rutas biosintéticas de 4-HB y se muestran con fines de ilustración en la figura 1. En las figuras 8-13 se describen rutas de 4-HB o BDO adicionales. Una ruta biosintética de 4-HB incluye la biosíntesis de 4-HB a partir de succinato (la ruta de succinato). Las enzimas que participan en esta ruta de 4-HB incluyen semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA y 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa. En esta ruta, la semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA cataliza la reacción inversa a la flecha mostrada en la figura 1. Otra ruta biosintética de 4-HB incluye la biosíntesis a partir de succinato a través de succinil-CoA (la ruta de succinil-CoA). Las enzimas que participan en esta ruta de 4-HB incluyen succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA y 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa. Otras tres rutas biosintéticas de 4-HB incluyen la biosíntesis de 4-HB a partir de α -cetoglutarato (las rutas de α -cetoglutarato). Por tanto, una tercera ruta biosintética de 4-HB es la biosíntesis de semialdehído succínico a través de glutamato:semialdehído succínico transaminasa, glutamato descarboxilasa y 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa. Una cuarta ruta biosintética de 4-HB también incluye la biosíntesis de 4-HB a partir de α -cetoglutarato, pero usa α -cetoglutarato descarboxilasa para catalizar la síntesis de semialdehído succínico. La 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa cataliza la conversión de semialdehído succínico en 4-HB. Una quinta ruta biosintética de 4-HB, incluye la biosíntesis a partir de α -cetoglutarato a través de succinil-CoA y usa α -cetoglutarato deshidrogenasa para producir succinil-CoA, que entra en la ruta de succinil-CoA descrita anteriormente. Cada una de estas rutas biosintéticas de 4-HB, sus sustratos, reactivos y productos, se describen adicionalmente a continuación en los ejemplos. Tal como se describe en el presente documento, 4-HB puede convertirse adicionalmente de manera biosintética en BDO mediante inclusión de enzimas apropiadas para producir BDO (véase el ejemplo). Por tanto, se entiende que puede usarse una ruta de 4-HB con enzimas para convertir 4-HB en BDO para generar una ruta de BDO.

Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación pueden producirse introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican para una o más de las enzimas que participan en una o más rutas biosintéticas de 4-HB o BDO. Dependiendo del organismo microbiano huésped elegido para la biosíntesis, pueden expresarse ácidos nucleicos para parte o la totalidad de una ruta biosintética de 4-HB o BDO particular. Por ejemplo, si un huésped elegido es deficiente en una o más enzimas en una ruta biosintética deseada, por ejemplo la ruta de succinato a 4-HB, entonces se introducen ácidos nucleicos expresables para la(s) enzima(s) deficiente(s), por ejemplo tanto para semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA como para 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa en este ejemplo, en el huésped para la posterior expresión exógena. Alternativamente, si el huésped elegido muestra expresión endógena de algunas enzimas de la ruta, pero es deficiente en otras, entonces se necesita un ácido nucleico codificante para la(s) enzima(s) deficiente(s) para lograr la biosíntesis de 4-HB o BDO. Por ejemplo, si el huésped elegido muestra semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA endógena, pero es deficiente en 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa, entonces se necesita un ácido nucleico codificante para esta enzima para lograr la biosíntesis de 4-HB. Por tanto, puede producirse un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la invención introduciendo actividades de proteínas o enzimas exógenas para obtener una ruta biosintética deseada o puede obtenerse una ruta biosintética deseada introduciendo una o más actividades de proteínas o enzimas exógenas que, junto con una o más enzimas o proteínas endógenas, producen un producto deseado tal como 4-HB o BDO.

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

glutamato:semialdehído succínico transaminasa, glutamato descarboxilasa y/o 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa, o α -cetoglutarato descarboxilasa y 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente enzimas de ruta para la producción de 4-HB o BDO, tal como se divulga en el presente documento.

Dependiendo de los constituyentes de la ruta biosintética de 4-HB o BDO de un organismo microbiano huésped seleccionado, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención incluirán al menos un ácido nucleico codificante de la ruta de 4-HB o BDO expresado de manera exógena y hasta todos los ácidos nucleicos codificantes para una o más rutas biosintéticas de 4-HB o BDO. Por ejemplo, puede establecerse la biosíntesis de 4-HB o BDO en un huésped deficiente en una enzima o proteína de ruta mediante expresión exógena del ácido nucleico codificante correspondiente. En un huésped deficiente en todas las enzimas o proteínas de una ruta de 4-HB o BDO, puede incluirse la expresión exógena de todas las enzimas o proteínas en la ruta, aunque se entiende que pueden expresarse todas las enzimas o proteínas de una ruta aunque el huésped contenga al menos una de las enzimas o proteínas de ruta. Por ejemplo, puede establecerse la biosíntesis de 4-HB a partir de las cinco rutas en un huésped deficiente en 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa a través de la expresión exógena de un ácido nucleico codificante para 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa. En cambio, puede establecerse la biosíntesis de 4-HB a partir de las cinco rutas en un huésped deficiente en las ocho enzimas a través de expresión exógena de las ocho de semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, glutamato descarboxilasa, α -cetoglutarato descarboxilasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y 4-hidroxiutanoato deshidrogenasa.

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

Generalmente, se selecciona un organismo huésped microbiano de manera que produce el precursor de una ruta de 4-HB o BDO, o bien como molécula producida de manera natural o bien como producto diseñado por ingeniería genética que proporciona o bien la producción *de novo* de un precursor deseado o bien la producción aumentada de un precursor producido de manera natural por el organismo huésped microbiano. Por ejemplo, succinil-CoA, α -cetoglutarato, 4-aminobutirato, glutamato, acetoacetil-CoA y homoserina se producen de manera natural en un organismo huésped tal como *E. coli*. Un organismo huésped puede diseñarse por ingeniería genética para aumentar la producción de un precursor, tal como se divulga en el presente documento. Además, puede usarse un organismo microbiano que se ha diseñado por ingeniería genética para producir un precursor deseado como organismo huésped y diseñarse adicionalmente por ingeniería genética para expresar enzimas o proteínas de una ruta de 4-HB o BDO.

En algunas divulgaciones, se genera un organismo microbiano que no se produce de manera natural a partir de un huésped que contiene la capacidad enzimática para sintetizar 4-HB o BDO. En esta divulgación específica puede ser útil aumentar la síntesis o acumulación de un producto de la ruta de 4-HB o BDO para, por ejemplo, impulsar las reacciones de la ruta de 4-HB o BDO hacia la producción de 4-HB o BDO. Puede lograrse el aumento de la síntesis o la acumulación, por ejemplo, mediante sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifican para una o más de las enzimas de ruta de 4-HB o BDO divulgadas en el presente documento. La sobreexpresión de la enzima o enzimas de la ruta de 4-HB o BDO puede producirse, por ejemplo, a través de expresión exógena del gen o los genes endógenos, o a través de expresión exógena del gen o los genes heterólogos. Por tanto, pueden generarse fácilmente organismos que se producen de manera natural para que sean organismos microbianos que producen 4-HB o BDO de manera no natural a través de la sobreexpresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, y así sucesivamente hasta todos los ácidos nucleicos que codifican para enzimas de la ruta biosintética de 4-HB o BDO. Además, puede generarse un organismo que no se produce de manera natural mediante mutagénesis de un gen endógeno que da como resultado un aumento de la actividad de una enzima en la ruta biosintética de 4-HB o BDO.

En realizaciones particularmente útiles, se emplea la expresión exógena de los ácidos nucleicos codificantes. La expresión exógena confiere la capacidad de diseñar a medida la expresión y/o los elementos reguladores en el huésped y la aplicación para lograr un nivel de expresión deseado que se controla por el usuario. Sin embargo, también puede usarse la expresión endógena en otras realizaciones tales como eliminando un efector regulador negativo o induciendo el promotor del gen cuando está asociado con un promotor inducible u otro elemento regulador. Por tanto, puede regularse por incremento un gen endógeno que tiene un promotor inducible que se produce de manera natural proporcionando el agente inductor apropiado, o puede modificarse por ingeniería genética la región reguladora de un gen endógeno para incorporar un elemento regulador inducible, permitiendo de

ese modo la regulación de la expresión aumentada de un gen endógeno en un momento deseado. De manera similar, puede incluirse un promotor inducible como elemento regulador para un gen exógeno introducido en un organismo microbiano que no se produce de manera natural (véanse los ejemplos).

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

Las fuentes de ácidos nucleicos codificantes para una enzima de la ruta de 4-HB o BDO pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie en la que el producto génico codificado puede catalizar la reacción a la que se hace referencia. Tales especies incluyen organismos tanto procariotas como eucariotas incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias, incluyendo arqueas y eubacterias, y eucariotas, incluyendo levadura, planta, insecto, animal y mamífero, incluyendo ser humano. Las especies a modo de ejemplo para tales fuentes incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium aminobutyricum*, *Clostridium subterminale*, *Clostridium sticklandii*, *Ralstonia eutropha*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Arabidopsis thaliana*, *Thermus thermophilus*, especies de *Pseudomonas*, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Homo sapiens*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rhodobacter spaeroides*, *Thermoanaerobacter brockii*, *Metallosphaera sedula*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Roseiflexus castenholzii*, *Erythrobacter*, *Simmondsia chinensis*, especies de *Acinetobacter*, incluyendo *Acinetobacter calcoaceticus* y *Acinetobacter baileyi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Sulfolobus tokodaii*, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis*, *Bacillus pumilus*, *Rattus norvegicus*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Euglena gracilis*, *Treponema denticola*, *Moorella thermoacetica*, *Thermotoga maritima*, *Halobacterium salinarum*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Aeropyrum pernix*, *Sus scrofa*, *Caenorhabditis elegans*, *Corynebacterium glutamicum*, *Acidaminococcus fermentans*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida*, *Aspergillus terreus*, *Pedococcus pentosaceus*, *Zymomonas mobilis*, *Acetobacter pasteurians*, *Kluyveromyces lactis*, *Eubacterium barkeri*, *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis*, *Natranaerobius thermophilus*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter amalonaticus*, *Myxococcus xanthus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Penicillium chrysogenum*, gammaproebacteria marina, bacteria productora de butirato, y otras divulgadas en el presente documento (véanse los ejemplos). Por ejemplo, los organismos microbianos que tienen producción biosintética de 4-HB o BDO se muestran a modo de ejemplo en el presente documento con referencia a huéspedes de levadura y *E. coli*. Sin embargo, con la secuencia genómica completa disponible ahora para más de 550 especies (estando más de la mitad de éstas disponibles en bases de datos públicas tales como el NCBI), incluyendo genomas de 395 microorganismos y una variedad de genomas de levaduras, hongos, plantas y mamíferos, la identificación de genes que codifican para la actividad biosintética de 4-HB o BDO requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, incluyendo por ejemplo, homólogos, ortólogos, parálogos y desplazamientos génicos no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos resulta rutinario y se conoce bien en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de 4-HB o BDO y otros compuestos descritos en el presente documento con referencia a un organismo particular tal como *E. coli* o levadura pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas por igual. Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica mostrada a modo de ejemplo en un organismo puede aplicarse igualmente a otros organismos.

En algunos casos, tales como cuando existe una ruta biosintética de 4-HB o BDO alternativa en una especie no relacionada, puede conferirse biosíntesis de 4-HB o BDO a la especie huésped, por ejemplo, mediante expresión exógena de un parálogo o parálogos de la especie no relacionada que catalizan una reacción metabólica similar, pero no idéntica, para sustituir a la reacción a la que se hace referencia. Dado que existen ciertas diferencias entre las redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la técnica entenderán que el uso de genes real entre diferentes organismos puede diferir. Sin embargo, dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el

presente documento, los expertos en la técnica también entenderán que las enseñanzas y los métodos de la invención pueden aplicarse a todos los organismos microbianos usando las alteraciones metabólicas relacionadas con las mostradas a modo de ejemplo en el presente documento para construir un organismo microbiano en una especie de interés que sintetizará 4-HB, tal como 4-HB monomérico, o BDO.

Pueden seleccionarse organismos microbianos huésped, y generarse los organismos microbianos que no se producen de manera natural, por ejemplo, de bacterias, levadura, hongo o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a procedimientos de fermentación. Las bacterias a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *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 ya que es un organismo microbiano bien caracterizado adecuado para el diseño por ingeniería genética. Otros organismos huésped particularmente útiles incluyen levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*.

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

Pueden introducirse de manera estable o transitoria secuencias de ácido nucleico exógenas implicadas en una ruta para la producción de 4-HB o BDO 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 pueden eliminarse antes de la transformación en células huésped procariotas, si se desea. Por ejemplo, la eliminación de una secuencia líder mitocondrial condujo a la expresión aumentada en *E. coli* (Hoffmeister *et al.*, J. Biol. Chem. 280:4329-4338 (2005)). Para la expresión exógena en levadura y otras células eucariotas, pueden expresarse genes en el citosol sin la adición de secuencia líder, o pueden dirigirse a la mitocondria o a otros orgánulos, o dirigirse para la secreción, mediante la adición de una secuencia de direccionamiento adecuada tal como una señal de secreción o de direccionamiento mitocondrial adecuada para las células huésped. Por tanto, se entiende que pueden incorporarse modificaciones apropiadas en una secuencia de ácido nucleico para eliminar o incluir una secuencia de direccionamiento en una secuencia de ácido nucleico exógena para conferir propiedades deseables. Además, pueden someterse genes a optimización de codones con técnicas bien conocidas en la técnica para lograr una expresión optimizada de las proteínas.

Puede construirse un vector o vectores de expresión para albergar una o más rutas biosintéticas de 4-HB y/o uno o más ácidos nucleicos codificantes biosintéticos para BDO tal como se muestra a modo de ejemplo en el presente documento unidos operativamente a secuencias de control de la expresión funcionales en el organismo huésped. Los vectores de expresión aplicables para su uso en los organismos huésped microbianos de la invención incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores de fago, vectores virales, episomas y cromosomas artificiales, incluyendo vectores y secuencias de selección o marcadores operables para la integración estable en un cromosoma huésped. Adicionalmente, los vectores de expresión pueden incluir uno o más genes de marcadores seleccionables y secuencias de control de la expresión apropiadas. También pueden incluirse genes de marcadores seleccionables que, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos que no están en los medios de cultivo. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores constitutivos e inducibles, potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, y similares que se conocen bien en la técnica. Cuando deben expresarse conjuntamente dos o más ácidos nucleicos codificantes exógenos, pueden insertarse ambos ácidos nucleicos, por ejemplo, en un vector de expresión individual o en vectores de expresión separados. Para el vector expresión individual, los ácidos nucleicos codificantes pueden unirse operacionalmente a una secuencia de control de la expresión común o unirse a diferentes secuencias de control de la expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ácido nucleico exógenas implicadas en una ruta metabólica o sintética puede confirmarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, análisis de ácidos nucleicos tal como transferencias de tipo Northern o amplificación de ARNm mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o inmunotransferencia para determinar 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 además se entiende 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.

Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención se construyen usando métodos bien conocidos en la técnica tal como se muestra a modo de ejemplo en el presente documento para expresar de manera exógena al menos un ácido nucleico que codifica para una enzima de la ruta de 4-HB o BDO en cantidades suficientes para producir 4-HB, tal como 4-HB monomérico, o BDO. Se entiende que los organismos microbianos de la invención se cultivan en condiciones suficientes para producir 4-HB o BDO. A continuación en los ejemplos se describen adicionalmente niveles de expresión a modo de ejemplo para enzimas de 4-HB en cada ruta. Siguiendo las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención pueden lograr la biosíntesis de 4-HB, tal como 4-HB monomérico, o BDO dando como resultado concentraciones intracelulares de entre aproximadamente 0,1-200 mM o más, por ejemplo 0,1-25 mM o más. Generalmente, la concentración intracelular de 4-HB, tal como 4-HB monomérico, o BDO es de entre aproximadamente 3-150 mM o más, de manera particular aproximadamente 5-125 mM o más, y más particularmente entre aproximadamente 8-100 mM, por ejemplo, aproximadamente 3-20 mM, particularmente entre aproximadamente 5-15 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-12 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM, 20 mM, 50 mM, 80 mM o más. También pueden lograrse concentraciones intracelulares entre y por encima de cada uno de estos intervalos a modo de ejemplo a partir de los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención. En realizaciones particulares, los organismos microbianos de la invención, particularmente cepas tales como las divulgadas en el presente documento (véanse los ejemplos XII-XIX y la tabla 28), pueden proporcionar la producción de un producto deseado tal como BDO aumentando la producción de BDO y/o disminuyendo los subproductos no deseados. Tales niveles de producción incluyen, pero no se limitan a, los divulgados en el presente documento y que incluyen desde aproximadamente 1 gramo hasta aproximadamente 25 gramos por litro, por ejemplo aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o incluso cantidades superiores de producto por litro.

En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo incluyen condiciones de crecimiento o mantenimiento anaerobias o sustancialmente anaerobias. Anteriormente se han descrito condiciones anaerobias a modo de ejemplo y se conocen bien en la técnica. En el presente documento se describen condiciones anaerobias a modo de ejemplo para procedimientos de fermentación y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 11/891.602, presentada el 10 de agosto de 2007. Cualquiera de estas condiciones puede emplearse con los organismos microbianos que no se producen de manera natural así como otras condiciones anaerobias bien conocidas en la técnica. En tales condiciones anaerobias, los productores de 4-HB o BDO pueden sintetizar 4-HB o BDO a concentraciones intracelulares de 5-10 mM o más así como todas las demás concentraciones mostradas a modo de ejemplo en el presente documento. Se entiende que, aunque la descripción anterior se refiere a concentraciones intracelulares, los organismos microbianos productores de 4-HB o BDO pueden producir 4-HB o BDO 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 de la invención en condiciones de cultivo anaerobias o sustancialmente anaerobias.

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

La divulgación también proporciona un biocatalizador microbiano que no se produce de manera natural que incluye un organismo microbiano que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxi-butanoico (4-HB) y 1,4-butanodiol (BDO) que incluyen al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, glutamato descarboxilasa, aldehído deshidrogenasa independiente de CoA, aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA o alcohol deshidrogenasa, en el que el ácido nucleico exógeno se expresa en cantidades suficientes para producir 1,4-butanodiol (BDO). La 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa también se conoce como 4-

hidroxibutiril CoA:acetil-CoA transferasa. En el presente documento también se divulgan enzimas de la ruta de 4-HB o BDO adicionales (véanse los ejemplos y las figuras 8-13).

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

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

Las rutas de BDO adicionales para introducir en productores de 4-HB incluyen, por ejemplo, la expresión exógena en un contexto genético deficiente huésped o la sobreexpresión de una o más de las enzimas mostradas a modo de ejemplo en la figura 1 como las etapas 9-13. Una ruta de este tipo incluye, por ejemplo, las actividades enzimáticas necesarias para llevar a cabo las reacciones mostradas como las etapas 9, 12 y 13 en la figura 1, en las que las aldehído y alcohol deshidrogenasas pueden ser enzimas separadas o una enzima multifuncional que tiene actividad tanto aldehído como alcohol deshidrogenasa. Otra ruta de este tipo incluye, por ejemplo, las actividades enzimáticas necesarias para llevar a cabo las reacciones mostradas como las etapas 10, 11, 12 y 13 en la figura 1, también en las que las aldehído y alcohol deshidrogenasas pueden ser enzimas separadas o una enzima multifuncional que tiene actividad tanto aldehído como alcohol deshidrogenasa. Por consiguiente, las rutas de BDO adicionales para introducir en productores de 4-HB incluyen, por ejemplo, la expresión exógena en un contexto genético deficiente huésped o la sobreexpresión de una o más de a 4-hidroxibutirato:CoA transferasa, butirato cinasa, fosfotransbutirilasa, aldehído deshidrogenasa independientemente de CoA, aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA o una alcohol deshidrogenasa. En ausencia de acil-CoA sintetasa endógena que pueda modificar 4-HB, los organismos microbianos productores de BDO que no se producen de manera natural pueden incluir además una acil-CoA sintetasa exógena selectiva para 4-HB, o la combinación de múltiples enzimas que tienen como reacción neta la conversión de 4-HB en 4-HB-CoA. Tal como se muestra a modo de ejemplo adicionalmente a continuación en los ejemplos, butirato cinasa y fosfotransbutirilasa muestran actividad de la ruta de BDO y catalizan las conversiones ilustradas en la figura 1 con un sustrato de 4-HB. Por tanto, estas enzimas también pueden denominarse en el presente documento 4-hidroxibutirato cinasa y fosfotranshidroxibutirilasa, respectivamente.

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

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

ALCOHOL DESHIDROGENASAS

ec: 1.1.1.1 alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.2 alcohol deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.4 (R,R)-butanodiol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.5 acetoina deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.6 glicerol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.7 propanodiol-fosfato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.8 glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD+)
 ec: 1.1.1.11 D-arabinitol 4-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.12 L-arabinitol 4-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.13 L-arabinitol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.14 L-iditol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.15 D-iditol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.16 galactitol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.17 manitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa

ec: 1.1.1.78 metilglioxal reductasa (dependiente de NADH)
 ec: 1.1.1.79 glioxilato reductasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.80 isopropanol deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.81 hidroxipiruvato reductasa
 ec: 1.1.1.82 malato deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.83 D-malato deshidrogenasa (descarboxilante)
 ec: 1.1.1.84 dimetilmalato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.85 3-isopropilmalato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.86 cetol-ácido reductoisomerasa
 ec: 1.1.1.87 homoisocitrato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.88 hidroximetilglutaril-CoA reductasa
 ec: 1.1.1.90 aril-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.91 aril-alcohol deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.92 oxaloglicolato reductasa (descarboxilante)
 ec: 1.1.1.94 glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

- ec: 1.1.1.18 inositol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.21 aldehído reductasa
 ec: 1.1.1.23 histidinol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.26 glioxilato reductasa
 ec: 1.1.1.27 L-lactato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.28 D-lactato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.29 glicerato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.30 3-hidroxi butirato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.31 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.35 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.36 acetoacetil-CoA reductasa
 ec: 1.1.1.37 malato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.38 malato deshidrogenasa (oxaloacetato-descarboxilante)
 ec: 1.1.1.39 malato deshidrogenasa (descarboxilante)
 ec: 1.1.1.40 malato deshidrogenasa (oxaloacetato-descarboxilante) (NADP+)
 ec: 1.1.1.41 isocitrato deshidrogenasa (NAD+)
 ec: 1.1.1.42 isocitrato deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.54 alil-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.55 lactaldehído reductasa (NADPH)
 ec: 1.1.1.56 ribitol 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.59 3-hidroxi propionato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.60 2-hidroxi-3-oxopropionato reductasa

 ec: 1.1.1.61 4-hidroxi butirato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.66 omega-hidroxi decanoato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.67 manitol 2-deshidrogenasa

 ec: 1.1.1.71 alcohol deshidrogenasa [NAD(P)+]

 ec: 1.1.1.72 glicerol deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.73 octanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.75 (R)-aminopropanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.76 (S,S)-butanodiol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.77 lactaldehído reductasa
 ec: 1.1.1.192 alcohol de cadena larga deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.194 coniferil-alcohol deshidrogenasa

 ec: 1.1.1.195 cinamil-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.198 (+)-borneol deshidrogenasa

 ec: 1.1.1.202 1,3-propanodiol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.207 (-)-mentol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.208 (+)-neomentol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.216 farnesol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.217 bencil-2-metil-hidroxi butirato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.222 (R)-4-hidroxi fenil lactato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.223 isopiperitenol deshidrogenasa

 ec: 1.1.1.226 4-hidroxiciclohexanocarboxilato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.229 2-metil-3-oxosuccinato de dietilo reductasa
 ec: 1.1.1.237 hidroxi fenil piruvato reductasa
 ec: 1.1.1.244 metanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.245 ciclohexanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.250 D-arabinol 2-deshidrogenasa

 ec: 1.1.1.251 galactitol 1-fosfato 5-deshidrogenasa

 ec: 1.1.1.255 manitol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.256 fluoren-9-ol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.257 4-(hidroximetil)bencenosulfonato [NAD(P)+]
 ec: 1.1.1.95 fosfoglicerato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.97 3-hidroxi bencil-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.101 acilglicerona-fosfato reductasa
 ec: 1.1.1.103 L-treonina 3-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.104 4-oxoprolina reductasa
 ec: 1.1.1.105 retinol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.110 indol-lactato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.112 indanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.113 L-xilosa 1-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.129 L-treonato 3-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.137 ribitol-5-fosfato 2-deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.138 manitol 2-deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.140 sorbitol-6-fosfato 2-deshidrogenasa

 ec: 1.1.1.142 D-pinitol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.143 secuoyitol deshidrogenasa

 ec: 1.1.1.144 perill-alcohol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.156 glicerol 2-deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.157 3-hidroxi butiril-CoA deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.163 ciclopentanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.164 hexadecanol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.165 2-alquil-1-ol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.166 hidroxiciclohexanocarboxilato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.167 hidroxi malonato deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.174 ciclohexano-1,2-diol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.177 glicerol-3-fosfato 1-deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.1.1.178 3-hidroxi-2-metilbutiril-CoA deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.185 L-glicol deshidrogenasa
 ec: 1.1.1.190 indol-3-acetaldehído reductasa (NADH)
 ec: 1.1.1.191 indol-3-acetaldehído reductasa (NADPH)

 ec: 1.2.1.15 malonato-semialdehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.16 succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(P)+]
 ec: 1.2.1.17 glioxilato deshidrogenasa (acilante)
 ec: 1.2.1.18 malonato-semialdehído deshidrogenasa (acetilante)
 ec: 1.2.1.19 aminobutiraldehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.20 glutarato-semialdehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.21 glicolaldehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.22 lactaldehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.23 2-oxoaldehído deshidrogenasa (NAD+)

 ec: 1.2.1.24 succinato-semialdehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.25 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (acilante)
 ec: 1.2.1.26 2,5-dioxovalerato deshidrogenasa

 ec: 1.2.1.27 metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa (acilante)
 ec: 1.2.1.28 benzaldehído deshidrogenasa (NAD+)
 ec: 1.2.1.29 aril-aldehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.30 aril-aldehído deshidrogenasa (NADP+)
 ec: 1.2.1.31 L-amino adipato-semialdehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.32 aminomuconato-semialdehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.36 retinal deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.39 fenilacetaldehído deshidrogenasa
 ec: 1.2.1.41 glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa

deshidrogenasa

ec: 1.1.1.258 6-hidroxihexanoato deshidrogenasa

ec: 1.1.1.259 3-hidroxipimeloil-CoA deshidrogenasa

ec: 1.1.1.261 glicerol-1-fosfato deshidrogenasa [NAD(P)+]

ec: 1.1.1.265 3-metilbutanal reductasa

ec: 1.1.1.283 metilglicoxal reductasa (dependiente de NADPH)

ec: 1.1.1.286 isocitrato-homoisocitrato deshidrogenasa

ec: 1.1.1.287 D-arabinitol deshidrogenasa (NADP+)

butanol deshidrogenasa

ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

ec: 1.2.1.2 formiato deshidrogenasa

ec: 1.2.1.3 aldehído deshidrogenasa (NAD+)

ec: 1.2.1.4 aldehído deshidrogenasa (NADP+)

ec: 1.2.1.5 aldehído deshidrogenasa [NAD(P)+]

ec: 1.2.1.7 benzaldehído deshidrogenasa (NADP+)

ec: 1.2.1.8 betaína-aldehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.9 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+)

ec: 1.2.1.10 acetaldehído deshidrogenasa (acetilante)

ec: 1.2.1.11 aspartato-semialdehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.12 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (fosforilante)

ec: 1.2.1.13 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NADP+) (fosforilante)

ec: 1.2.1.64 4-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.65 salicilaldehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.66 formaldehído deshidrogenasa dependiente de micotiol

ec: 1.2.1.67 vanilina deshidrogenasa

ec: 1.2.1.68 coniferil-aldehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.69 fluoroacetaldehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.71 succinilglutamato-semialdehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.42 hexadecanal deshidrogenasa (acilante)

ec: 1.2.1.43 formiato deshidrogenasa (NADP+)

ec: 1.2.1.45 4-carboxi-2-hidroxiuconato-6-semialdehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.46 formaldehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.47 4-trimetilamoniobutiraldehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.48 aldehído de cadena larga deshidrogenasa

ec: 1.2.1.49 2-oxoaldehído deshidrogenasa (NADP+)

ec: 1.2.1.51 piruvato deshidrogenasa (NADP+)

ec: 1.2.1.52 oxoglutarato deshidrogenasa (NADP+)

ec: 1.2.1.53 4-hidroxifenilacetaldehído deshidrogenasa

ec: 1.2.1.57 butanal deshidrogenasa

ec: 1.2.1.58 fenilglicoxilato deshidrogenasa (acilante)

ec: 1.2.1.59 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NAD(P)+) (fosforilante)

ec: 1.2.1.62 4-formilbencenosulfonato deshidrogenasa

ec: 1.2.1.63 6-oxohexanoato deshidrogenasa

En el presente documento se divulgan otras enzimas y rutas a modo de ejemplo (véanse los ejemplos). Además, se entiende que pueden usarse enzimas para llevar a cabo reacciones para las que el sustrato no es el sustrato natural. Aunque la actividad para el sustrato no natural puede ser menor que para el sustrato natural, se entiende que tales enzimas pueden usarse, ya sea tal como se producen de manera natural o modificadas usando la evolución dirigida o evolución adaptiva, tal como se divulga en el presente documento (véanse también los ejemplos).

La producción de BDO mediante cualquiera de las rutas divulgadas en el presente documento se basa, en parte, en la identificación de las enzimas apropiadas para la conversión de precursores en BDO. Se han identificado varias enzimas específicas para varias de las etapas de reacción. Para aquellas transformaciones en las que no se han identificado enzimas específicas para los precursores de reacción, se han identificado candidatos enzimáticos que son los más adecuados para catalizar las etapas de reacción. Se ha mostrado que las enzimas funcionan sobre una amplia gama de sustratos, tal como se comenta a continuación. Además, avances en el campo del diseño por ingeniería genética de proteínas también hacen viable alterar enzimas para que actúen de manera eficaz sobre sustratos, aunque no sea un sustrato natural. A continuación se describen varios ejemplos de enzimas de amplia especificidad de diversas clases adecuadas para una ruta de BDO así como métodos que se han usado para hacer evolucionar enzimas para que actúen sobre sustratos no naturales.

Una clase clave de enzimas en rutas de BDO son las oxidorreductasas que interconvierten cetonas o aldehídos en alcoholes (1.1.1). Numerosas enzimas a modo de ejemplo en esta clase pueden funcionar sobre una amplia gama de sustratos. Se mostró que una alcohol deshidrogenasa (1.1.1.1) purificada a partir de la bacteria del suelo *Brevibacterium* sp KU 1309 (Hirano *et al.*, J. Biosc. Bioeng. 100:318-322 (2005)) funcionaba sobre una gran cantidad de alcoholes alifáticos así como aromáticos con altas actividades. La tabla 2 muestra la actividad de la enzima y su K_m sobre diferentes alcoholes. La enzima es reversible y también tiene una actividad muy alta sobre varios aldehídos (tabla 3).

Tabla 2. Actividades relativas de una alcohol deshidrogenasa de *Brevibacterium* sp KU para oxidar diversos alcoholes.

Sustrato	Actividad relativa (0%)	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	

*Se tomó la actividad de 2-feniletanol, correspondiente a 19,2 U/mg, como el 100%.

Tabla 3. Actividades relativas de una alcohol deshidrogenasa de *Brevibacterium* sp KU 1309 para reducir diversos compuestos de carbonilo.

Sustrato	Actividad relativa (0%)	K _m (mM)
Fenilacetaldehído	100	0,261
2-Fenilpropionaldehído	188	0,864
1-Octilaldehído	87	
Acetofenona	0	

La lactato deshidrogenasa (1.1.1.27) de *Ralstonia eutropha* es otra enzima que se ha demostrado que tiene actividades altas sobre varios 2-oxoácidos tales como 2-oxobutirato, 2-oxopentanoato y 2-oxoglutarato (un compuesto C5 análogo a 2-oxoadipato) (Steinbuchel y Schlegel, Eur. J. Biochem. 130:329-334 (1983)). La columna 2 en la tabla 4 demuestra las actividades de IdhA de *R. eutropha* (anteriormente *A. eutrophus*) sobre diferentes sustratos (Steinbuchel y Schlegel, citado anteriormente, 1983).

Tabla 4. La actividad *in vitro* de IdhA de *R. eutropha* (Steinbuchel y Schlegel, citado anteriormente, 1983) sobre diferentes sustratos y comparada aquella sobre piruvato.

Sustrato	L(+)-lactato deshidrogenasa de <i>A. eutrophus</i>	Actividad (%) de L(+)-lactato deshidrogenasa de músculo de conejo	D(-)-lactato deshidrogenasa de <i>L. leichmanii</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

Se ha mostrado que las oxidorreductasas que pueden convertir 2-oxoácidos en sus homólogos de acil-CoA (1.2.1) también aceptan múltiples sustratos. Por ejemplo, el complejo de 2-ceto-ácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCKAD), también conocido como 2-oxoisovalerato deshidrogenasa (1.2.1.25), participa en rutas de degradación de aminoácidos de cadena ramificada, convirtiendo derivados de 2-ceto-ácidos 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. 32:911-922 (1993)), se ha mostrado que este complejo tiene una amplia gama de sustratos 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 miembros de aún otra clase de enzimas, concretamente aminotransferasas (2.6.1), actúan sobre múltiples sustratos. Se ha identificado aspartato aminotransferasa (aspAT) de *Pyrococcus fursious*, se ha expresado en *E. coli* y se ha caracterizado la proteína recombinante para demostrar que la enzima tiene las mayores actividades frente a aspartato y alfa-cetoglutarato pero actividades menores, aunque significativas, frente a alanina, glutamato y los aminoácidos aromáticos (Ward *et al.*, Archaea 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)) tenía una amplia especificidad de sustrato frente a tirosina (actividad considerada del 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 especificidad amplia similar para una tirosina aminotransferasa de *Trypanosoma cruzi*, aunque ambas de estas enzimas tienen una homología de secuencia de tan sólo el 6%. 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)).

Se ha demostrado que las CoA transferasas (2.8.3) tienen la capacidad para actuar sobre más de un sustrato. Específicamente, se purificó una CoA transferasa a partir de *Clostridium acetobutylicum* y se notificó que tenía las mayores actividades sobre acetato, propionato y butirato. También tenía actividades significativas con valerato, isobutirato y crotonato (Wiesenborn *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 55:323-329 (1989)). En otro estudio, se ha mostrado que la enzima de *E. coli* acil-CoA:acetato-CoA transferasa, también conocida como acetato-CoA transferasa (EC 2.8.3.8), transfiere el resto CoA a acetato a partir de una variedad de sustratos de acil-CoA ramificados y lineales, incluyendo isobutirato (Matthies y Schink, App. Environm. Microbiol. 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel *et al.*, Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908 (1968b)) y butanoato (Vanderwinkel *et al.*, Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908 (1968a)).

Otras clases de enzimas soportan adicionalmente una amplia especificidad de sustrato para enzimas. También se ha demostrado que algunas isomerasas (5.3.3) funcionan sobre múltiples sustratos. Por ejemplo, L-ramnosa isomerasa de *Pseudomonas stutzeri* cataliza la isomerización entre diversas aldolasas y cetosas (Yoshida *et al.*, J. Mol. Biol. 365:1505-1516 (2007)). Esto incluye la isomerización entre L-ramnosa y L-ramnulosa, L-manosa y L-fructosa, L-xilosa y L-xilulosa, D-ribosa y D-ribulosa, y D-alosa y D-psicosa.

En aún otra clase de enzimas, las fosfotransferasas (2.7.1), se encontró que la homoserina cinasa (2.7.1.39) de *E. coli* que convierte L-homoserina en fosfato de L-homoserina, fosforilaba numerosos análogos de homoserina. En estos sustratos, el grupo funcional carboxilo en la posición R se había sustituido por un éster o por un grupo hidroximetilo (Huo y Viola, Biochemistry 35:16180-16185 (1996)). La tabla 5 demuestra la amplia especificidad de sustrato de esta cinasa.

Tabla 5. La especificidad de sustrato de homoserina cinasa.

Sustrato	k_{cat}	% de k_{cat}	K_m (mM)	k_{cat}/K_m
L-homoserina	$18,3 \pm 0,1$	100	$0,14 \pm 0,04$	184 ± 17
D-homoserina	$8,3 \pm 1,1$	32	$31,8 \pm 7,2$	$0,26 \pm 0,03$
L-aspartato β -semialdehído	$2,1 \pm 0,1$	8,2	$0,28 \pm 0,02$	$7,5 \pm 0,3$
L-2-amino-1,4-butanodiol	$2,0 \pm 0,5$	7,9	$11,6 \pm 6,5$	$0,17 \pm 0,06$
L-2-amino-5-hidroxivalerato	$2,5 \pm 0,4$	9,9	$1,1 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,3$
éster metílico de L-homoserina	$14,7 \pm 2,6$	80	$4,9 \pm 2,0$	$3,0 \pm 0,6$
éster etílico de L-homoserina	$13,6 \pm 0,8$	74	$1,9 \pm 0,5$	$7,2 \pm 1,7$
éster isopropílico de L-homoserina	$13,6 \pm 1,4$	74	$1,2 \pm 0,5$	$11,3 \pm 1,1$
éster <i>n</i> -propílico de L-homoserina	$14,0 \pm 0,4$	76	$3,5 \pm 0,4$	$4,0 \pm 1,2$
éster isobutílico de L-homoserina	$16,4 \pm 0,8$	84	$6,9 \pm 1,1$	$2,4 \pm 0,3$
éster <i>n</i> -butílico de L-homoserina	$29,1 \pm 1,2$	160	$5,8 \pm 0,8$	$5,0 \pm 0,5$

Otra clase de enzimas útiles en rutas de BDO son las ácido-tiol ligasas (6.2.1). Como enzimas en otras clases, se ha determinado que ciertas enzimas en esta clase tienen una amplia especificidad de sustrato. Por ejemplo, se ha demostrado que la acil CoA ligasa de *Pseudomonas putida* funciona sobre varios sustratos alifáticos incluyendo ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico, heptanoico y octanoico y sobre compuestos aromáticos tales como ácidos fenilacético y fenoxiacético (Fernandez-Valverde *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 59:1149-1154 (1993)). Una enzima relacionada, malonil CoA sintetasa (6.3.4.9) de *Rhizobium trifolii*, puede convertir varios diácidos, concretamente, etil, propil, alil, isopropil, dimetil, ciclopropil, ciclopropilmetilén, ciclobutil y bencil-malonato en sus correspondientes monitoésteres (Pohl *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 123:5822-5823 (2001)). De manera similar, también se han encontrado descarboxilasas (4.1.1) con amplias gamas de sustrato. 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 aislada de *Saccharomyces cerevisiae* tiene una amplia gama de sustrato para 2-ceto-ácidos alifáticos incluyendo 2-cetobutirato, 2-cetovalerato y 2-fenilpiruvato (Li y Jordan, Biochemistry 38:10004-10012 (1999)). De manera similar, la benzoilformiato descarboxilasa tiene una amplia gama de sustrato y ha sido objeto de estudios de diseño por ingeniería genética de

enzimas. La enzima de *Pseudomonas putida* se ha estudiado ampliamente y están disponibles estructuras cristalinas de esta enzima (Polovnikova *et al.*, Biochemistry 42:1820-1830 (2003); Hasson *et al.*, Biochemistry 37:9918-9930 (1998)). Se ha mostrado que la alfa-cetoácido de cadena ramificada descarboxilasa (BCKA) actúa sobre una variedad de compuestos de longitud de cadena variable desde 3 hasta 6 carbonos (Oku y Kaneda, J. Biol. Chem. 263:18386-18396 (1998); Smit *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 71:303-311 (2005b)). La enzima en *Lactococcus lactis* se ha caracterizado 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.*, Appl. Environ. Microbiol. 71:303-311 (2005a)).

De manera interesante, también se ha notificado que enzimas que se sabe que tienen una actividad dominante catalizan una función muy diferente. Por ejemplo, se sabe que la fosfoglicerato mutasa dependiente de cofactor (5.4.2.1) de *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis* también funciona como fosfatasa (Rigden *et al.*, Protein Sci. 10:1835-1846 (2001)). Se sabe que la enzima de *B. stearothermophilus* tiene actividad sobre varios sustratos, incluyendo 3-fosfoglicerato, alfa-naftilfosfato, p-nitrofenilfosfato, AMP, fructosa-6-fosfato, ribosa-5-fosfato y CMP.

A diferencia de 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 frente a sus sustratos no naturales. Alternativamente, también se ha cambiado la preferencia de sustrato de una enzima usando evolución dirigida. Por tanto, resulta viable diseñar por ingeniería genética una enzima dada para obtener una función eficaz sobre un sustrato natural, por ejemplo, eficacia mejorada, o sobre un sustrato no natural, por ejemplo, eficacia aumentada. Por ejemplo, se ha notificado que se mejoró significativamente la enantioselectividad de una lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* (Reetz *et al.*, Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 36:2830-2832 (1997)). Esta enzima hidrolizó 2-metildecanoato de p-nitrofenilo con un exceso enantiomérico (ee) de tan sólo el 2% en favor del ácido (S). Sin embargo, tras cuatro rondas sucesivas de mutagénesis propensa a error y examen, se produjo una variante que catalizaba la reacción requerida con un ee del 81% (Reetz *et al.*, Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 36:2830-2832 (1997)).

Se han usado métodos de evolución dirigida para modificar una enzima para que funcione sobre una matriz 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 permitió la aceptación de ésteres de ácidos carboxílicos sustituidos en alfa por esta enzima (Reetz *et al.*, Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 44:4192-4196 (2005)). En otra modificación satisfactoria de una enzima, se empleó intercambio de ADN para crear una aminotransferasa de *Escherichia coli* que aceptaba sustratos ramificados en β , que se aceptaban mal por la enzima de tipo natural (Yano *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 95:5511-5515 (1998)). Específicamente, al final de cuatro rounds de intercambio, la actividad aspartato aminotransferasa para valina y 2-oxovalina aumentó en hasta cinco órdenes de magnitud, al tiempo que disminuyó la actividad frente al sustrato natural, aspartato, en hasta 30 veces. Recientemente, se usó un algoritmo para diseñar una retro-aldolasa que podía usarse para catalizar la escisión de enlace carbono-carbono en un sustrato no natural y no biológico, 4-hidroxi-4-(6-metoxi-2-naftil)-2-butanona (Jiang *et al.*, Science 319:1387-1391 (2008)). Estos algoritmos usaron diferentes combinaciones de cuatro motivos catalíticos diferentes para diseñar una nueva enzima, y 20 de los diseños seleccionados para caracterización experimental tenían velocidades mejoradas cuatro veces con respecto a la reacción sin catalizar (Jiang *et al.*, Science 319:1387-1391 (2008)). Por tanto, no sólo son estos enfoques de diseño por ingeniería genética capaces de expandir la matriz de sustratos sobre los que puede actuar una enzima, sino que permiten el diseño y la construcción de enzimas muy eficaces. Por ejemplo, se notificó que un método de intercambio de ADN (quimeragénesis al azar sobre moldes transitorios o RACHITT) conducía a una monooxigenasa diseñada por ingeniería genética que tenía una velocidad de desulfuración mejorada sobre 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 triosafosfato isomerasa mutante lenta se mejoró hasta 19 veces partiendo de 1,3 veces (Hermes *et al.*, Proc. Nat. 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 pudo rastrearse el origen de la mejora a mutaciones en seis residuos de aminoácido.

También se ha demostrado en varios estudios la eficacia de enfoques de diseño por ingeniería genética de proteínas para alterar la especificidad de sustrato de una enzima para un sustrato deseado. Se modificó isopropilmalato deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* cambiando residuos cerca del sitio activo de modo que ahora podía actuar 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. Por ejemplo, la dihidroflavonol 4-reductasa para la que se cambió un único aminoácido en la supuesta región de unión a sustrato podía reducir de manera preferible 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 (Doile *et al.*, Biochemistry 40:4234-4241 (2001)). De manera similar, la especificidad de cofactor de una 1,5-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ se alteró 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 de modelado molecular para identificar los residuos clave para la modificación, que se estudiaron adicionalmente mediante mutagénesis dirigida al sitio.

Existen numerosos ejemplos que abarcan diversas clases de enzimas en las que la función de enzima se cambió para favorecer un sustrato no natural con respecto al sustrato natural de la enzima. 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 y Kirsch, 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) frente a sustratos naturales y no naturales (Siegert *et al.*, Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)). Se sometió citocromo c peroxidasa (CCP) de *Saccharomyces cerevisiae* a evolución molecular dirigida para generar mutantes con actividad aumentada frente al sustrato clásico de la peroxidasa, guaiacol, cambiando por tanto 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 guaiacol 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 cualquiera de las enzimas originales. Por ejemplo, la degradación de bifenilos policlorados mediada por bifenil dioxigenasa se mejoró 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 de las enzimas originales y potenciaron la actividad de degradación frente a compuestos de bifenilo relacionados e hidrocarburos con un único anillo aromático tales como tolueno y benceno que originalmente eran malos sustratos para la enzima.

Además de cambiar la especificidad de enzima, también es posible potenciar las actividades sobre sustratos para los que las enzimas tienen de manera natural actividades bajas. Un estudio demostró que la aminoácido racemasa de *P. putida* que tenía una amplia especificidad de sustrato (sobre lisina, arginina, alanina, serina, metionina, cisteína, leucina e histidina, entre otros) pero baja actividad frente a triptófano podía mejorarse significativamente mediante mutagénesis al azar (Kino *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:1299-1305 (2007)). De manera similar, se diseñó por ingeniería genética el sitio activo de la BCKAD bovina para favorecer el sustrato alternativo acetyl-CoA (Meng y Chuang, Biochemistry 33:12879-12885 (1994)). Un aspecto interesante de estos enfoques es que aunque se han aplicado métodos aleatorios para generar estas enzimas mutadas con actividades eficaces, pueden identificarse las mutaciones o cambios estructurales exactos que confieren la mejora en la actividad. Por ejemplo, en el estudio mencionado anteriormente, se rastreó 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 peroxidasa del rábano a mutagénesis al azar y recombinación génica, se identificaron mutantes que tenían una actividad más de 14 veces superior a la del tipo natural (Lin *et al.*, Biotechnol. Prog. 15:467-471 (1999)).

Otro ejemplo 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 creía que determinaban la especificidad frente a diferentes hidroxácidos (Clarke *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 148:15-23 (1987)). Tras estas mutaciones, se aumentó la especificidad para oxaloacetato con respecto a piruvato hasta 500 a diferencia de la enzima de tipo natural que tenía una especificidad catalítica para piruvato con respecto a oxaloacetato de 1000. Se diseñó adicionalmente esta enzima por ingeniería genética usando mutagénesis dirigida al sitio para tener actividad frente a piruvatos sustituidos de cadena ramificada (Wilks *et al.*, Biochemistry 29:8587-8591 (1990)). Específicamente, la enzima tenía una mejora de 55 veces en la 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 frente a malato (Wilks *et al.*, Science 242:1541-1544 (1988)). Posteriormente se diseñó por ingeniería genética la misma enzima de *B. stearothermophilus* para tener una alta actividad catalítica frente a alfa-cetoácidos con cadenas laterales cargadas positivamente, tales como las 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-cetoácido. De manera interesante, esta enzima también se modificó estructuralmente 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 lo que permitió escindir una región del gen. Esta región codificaba para un bucle de superficie móvil del polipéptido (residuos 98-110) que normalmente sella el sitio activo frente a disolvente voluminoso y es un determinante principal de la especificidad de sustrato. Los bucles de secuencia y longitud variables se insertaron de modo que se generaron hidroxácido deshidrogenasas con especificidades de sustrato alteradas. Con una construcción de bucle más larga, la actividad con piruvato se redujo un millón de veces pero la actividad con fenilpiruvato permaneció ampliamente sin alterar. Se logró un cambio en la especificidad (k_{cat}/K_m) de 390.000 veces. La selectividad de 1700:1 de esta enzima para fenilpiruvato con respecto a piruvato es la requerida en una fenil-lactato deshidrogenasa. Los estudios descritos anteriormente indican que pueden usarse diversos enfoques de diseño por

ingeniería genética de enzimas para obtener enzimas para las rutas de BDO tal como se divulga en el presente documento.

Tal como se divulga en el presente documento, pueden usarse rutas biosintéticas para 1,4-butanodiol a partir de varios productos intermedios metabólicos centrales, incluyendo acetil-CoA, succinil-CoA, alfa-cetoglutarato, glutamato, 4-aminobutirato y homoserina. Acetil-CoA, succinil-CoA y alfa-cetoglutarato son productos intermedios comunes del ciclo de ácido tricarboxílico (TCA), una serie de reacciones que está presente en su totalidad en prácticamente todas las células vivas que usan oxígeno para la respiración celular y está presente en formas truncadas en varios organismos anaerobios. Glutamato es un aminoácido que se deriva de alfa-cetoglutarato mediante glutamato deshidrogenasa o cualquiera de varias reacciones de transaminación (véase la figura 8B). Puede formarse 4-aminobutirato mediante la descarboxilación de glutamato (véase la figura 8B) o a partir de acetoacetil-CoA a través de la ruta divulgada en la figura 9C. Acetoacetil-CoA se deriva de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA mediante la enzima, acetil-coenzima A acetiltransferasa, o de manera equivalente, acetoacetil-coenzima A tiolasa. Homoserina es un producto intermedio en el metabolismo de treonina y metionina, formado a partir de oxaloacetato a través de aspartato. La conversión de oxaloacetato en homoserina requiere un NADH, dos NADPH y un ATP.

También pueden emplearse rutas distintas de las mostradas a modo de ejemplo anteriormente para generar la biosíntesis de BDO en organismos microbianos que no se producen de manera natural. En una divulgación, puede lograrse la biosíntesis usando una ruta de L-homoserina a BDO (véase la figura 13). Esta ruta tiene un rendimiento molar de 0,90 mol/mol de glucosa, que parece limitado por la disponibilidad de equivalentes reductores. Una segunda ruta sintetiza BDO a partir de acetoacetil-CoA y puede lograr un rendimiento teórico máximo de 1,091 mol/mol de glucosa (véase la figura 9). Puede lograrse la implementación de cualquier ruta mediante la introducción de dos enzimas exógenas en un organismo huésped tal como *E. coli*, y ambas rutas pueden complementar adicionalmente la producción de BDO por medio de succinil-CoA. A continuación se describen adicionalmente las enzimas, termodinámica, rendimientos teóricos y viabilidad global de las rutas.

También puede diseñarse por ingeniería genética una ruta de homoserina para generar organismos microbianos productores de BDO. La homoserina es un producto intermedio en el metabolismo de treonina y metionina, formada a partir de oxaloacetato por medio de aspartato. La conversión de oxaloacetato en homoserina requiere un NADH, dos NADPH y un ATP (figura 2). Una vez formada, se alimenta la homoserina a rutas biosintéticas tanto para treonina como para metionina. En la mayoría de los organismos, altos niveles de treonina o metionina se retroalimentan para reprimir la ruta de biosíntesis de homoserina (Caspi *et al.*, Nucleic Acids Res. 34: D511-D516 (1990)).

La transformación de homoserina en 4-hidroxibutirato (4-HB) puede lograrse en dos etapas enzimáticas tal como se describe en el presente documento. La primera etapa de esta ruta es la desaminación de homoserina mediante una supuesta amoniaco liasa. En la etapa 2, se reduce el producto alqueno, 4-hidroxibut-2-enoato, para dar 4-HB mediante una supuesta reductasa a costa de un NADH. Entonces puede convertirse 4-HB en BDO.

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

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

También puede diseñarse por ingeniería genética una ruta de acetoacetato para generar organismos microbianos

productores de BDO. Puede formarse acetoacetato a partir de acetil-CoA mediante enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, incluyendo acetil-CoA acetiltransferasa y acetoacetil-CoA transferasa. Las rutas biosintéticas a través de acetoacetato también son particularmente útiles en organismos microbianos que pueden metabolizar compuestos de carbono individuales tales como monóxido de carbono, dióxido de carbono o metanol, para formar acetil-CoA.

Puede usarse una ruta de tres etapas a partir de acetoacetil-CoA para dar 4-aminobutirato (véase la figura 9C) para sintetizar BDO a través de acetoacetil-CoA. Puede convertirse 4-aminobutirato en semialdehído succínico tal como se muestra en la figura 8B. Puede convertirse semialdehído succínico, que está separado por una etapa de reducción de succinil-CoA o está separado por una etapa de descarboxilación de α -cetoglutarato, en BDO siguiendo tres etapas de reducción (figura 1). En resumen, la etapa 1 de esta ruta implica la conversión de acetoacetil-CoA en acetoacetato, por ejemplo, mediante la acetoacetil-CoA transferasa de *E. coli* codificada por los genes *atoA* y *atoD* (Hanai *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 73: 7814-7818 (2007)). La etapa 2 de la biorruta de acetoacetil-CoA conlleva la conversión de acetoacetato en 3-aminobutanoato mediante una ω -aminotransferasa. Se sobreexpresó la ω -aminoácido:piruvato aminotransferasa (ω -APT) de *Alcaligenes denitrificans* en *E. coli* y se mostró que tenía una alta actividad frente a 3-aminobutanoato *in vitro* (Yun *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 70:2529-2534 (2004)).

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

La ruta sintética para dar BDO a partir de acetoacetil-CoA pasa a través de 4-aminobutanoato, un metabolito en *E. coli* que se forma normalmente a partir de la descarboxilación de glutamato. Una vez formado, puede convertirse 4-aminobutanoato en semialdehído succínico mediante 4-aminobutanoato transaminasa (2.6.1.19), una enzima que se ha caracterizado bioquímicamente.

Una consideración para seleccionar enzimas candidatas en esta ruta es la estereoselectividad de las enzimas implicadas en las etapas 2 y 3. La ω -ABT en *Alcaligenes denitrificans* es específica para el estereoisómero L de 3-aminobutanoato, mientras que D-lisina-5,6-aminomutasa requiere probablemente el estereoisómero D. Si no se encuentran inicialmente o se diseñan por ingeniería genética enzimas con estereoselectividad complementaria, puede añadirse una tercera enzima a la ruta con actividad racemasa que puede convertir L-3-aminobutanoato en D-3-aminobutanoato. Aunque las aminoácido racemasas están generalizadas, se desconoce si estas enzimas pueden funcionar con ω -aminoácidos.

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

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

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

El diseño y la construcción de organismos microbianos modificados genéticamente se lleva a cabo usando métodos bien conocidos en la técnica para lograr cantidades suficientes de expresión para producir BDO. En particular, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención pueden lograr la biosíntesis de BDO

dando como resultado concentraciones intracelulares de entre aproximadamente 0,1-200 mM o más, tal como aproximadamente 0,1-25 mM o más, tal como se comentó anteriormente. Por ejemplo, la concentración intracelular de BDO es de entre aproximadamente 3-20 mM, particularmente entre aproximadamente 5-15 mM y más particularmente entre aproximadamente 8-12 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM o más. También pueden lograrse concentraciones intracelulares entre y por encima de cada uno de estos intervalos a modo de ejemplo a partir de los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la invención. Como con los productores de 4-HB, los productores de BDO también pueden sustentarse, cultivarse o fermentarse en condiciones anaerobias.

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

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

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

Se proporcionan adicionalmente métodos para producir BDO cultivando un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de BDO de la invención. La ruta de BDO puede comprender al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA oxidorreductasa (desaminación), 4-aminobutiril-CoA transaminasa o 4-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa (véase el ejemplo VII y la tabla 17).

Alternativamente, la ruta de BDO puede comprender al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO 4-aminobutirato CoA transferasa, 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutirato-CoA ligasa, 4-aminobutiril-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-aminobutiril-CoA reductasa, 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminación) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa (véase el ejemplo VII y la tabla 18).

Además, la divulgación proporciona un método para producir BDO, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de BDO, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO 4-aminobutirato cinasa, 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación), 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa, 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminación), 4-aminobutan-1-ol transaminasa, ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico oxidorreductasa (desaminación), ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico transaminasa, 4-hidroxi-butiril-fosfato deshidrogenasa o 4-hidroxi-butiraldehído deshidrogenasa (fosforilación) (véase el ejemplo VII y la tabla 19).

La divulgación proporciona además un método para producir BDO, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de BDO, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO alfa-cetoglutarato 5-cinasa, semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación), ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa, alfa-cetoglutarato CoA transferasa, alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa, alfa-cetoglutaril-CoA ligasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa, alfa-cetoglutaril-CoA reductasa

(formación de alcohol), ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa o ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase el ejemplo VIII y la tabla 20).

La divulgación proporciona adicionalmente un método para producir BDO, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de BDO, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO glutamato CoA transferasa, glutamil-CoA hidrolasa, glutamil-CoA ligasa, glutamato 5-cinasa, glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación), glutamil-CoA reductasa, glutamato-5-semialdehído reductasa, glutamil-CoA reductasa (formación de alcohol), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminación), ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa, ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (véase el ejemplo IX y la tabla 21).

La divulgación incluye adicionalmente un método para producir BDO, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de BDO, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxi-butiril-CoA deshidratasa, vinilacetil-CoA Δ -isomerasa o 4-hidroxi-butiril-CoA deshidratasa (véase el ejemplo X y la tabla 22).

También se proporciona un método para producir BDO, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de BDO, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO homoserina desaminasa, homoserina CoA transferasa, homoserina-CoA hidrolasa, homoserina-CoA ligasa, homoserina-CoA desaminasa, 4-hidroxi-but-2-enoil-CoA transferasa, 4-hidroxi-but-2-enoil-CoA hidrolasa, 4-hidroxi-but-2-enoil-CoA ligasa, 4-hidroxi-but-2-enoato reductasa, 4-hidroxi-butiril-CoA transferasa, 4-hidroxi-butiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxi-butiril-CoA ligasa o 4-hidroxi-but-2-enoil-CoA reductasa (véase el ejemplo XI y la tabla 23).

La divulgación proporciona adicionalmente un método para producir BDO, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de BDO, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO succinil-CoA reductasa (formación de alcohol), 4-hidroxi-butiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxi-butiril-CoA ligasa, 4-hidroxi-butanal deshidrogenasa (fosforilación). Una ruta de BDO de este tipo puede comprender además succinil-CoA reductasa, 4-hidroxi-butanal deshidrogenasa, 4-hidroxi-butiril-CoA transferasa, 4-hidroxi-butanal cinasa, fosfotrans-4-hidroxi-butanal, 4-hidroxi-butiril-CoA reductasa, 4-hidroxi-butiril-CoA reductasa (formación de alcohol), o 1,4-butanodiol deshidrogenasa.

También se proporciona un método para producir BDO, que comprende cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de BDO, comprendiendo la ruta al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO, comprendiendo la ruta de BDO glutamato deshidrogenasa, 4-aminobutirato oxidorreductasa (desaminación), 4-aminobutirato transaminasa, glutamato descarboxilasa, 4-hidroxi-butiril-CoA hidrolasa, 4-hidroxi-butiril-CoA ligasa, 4-hidroxi-butanal deshidrogenasa (fosforilación).

La invención proporciona adicionalmente métodos de producción de un producto deseado usando los organismos genéticamente modificados divulgados en el presente documento que permiten una producción mejorada de un producto deseado tal como BDO aumentando el producto o disminuyendo subproductos no deseados. Por tanto, la invención proporciona un método para producir 1,4-butanodiol (BDO), que comprende cultivar los organismos microbianos que no se producen de manera natural divulgados en el presente documento en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO. En una realización, la invención proporciona un método de producción de BDO usando un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que comprende un organismo microbiano que tiene una ruta de 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO. En una realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar succinil-CoA sintetasa exógena (véase el ejemplo XII). Por ejemplo, la succinil-CoA sintetasa puede codificarse por unos genes *sucCD* de *Escherichia coli*.

En otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar alfa-cetoglutarato descarboxilasa exógena (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la alfa-cetoglutarato descarboxilasa puede codificarse por el gen *sucA* de *Mycobacterium bovis*. En todavía otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar succinato semialdehído deshidrogenasa y 4-hidroxi-butanal deshidrogenasa y opcionalmente 4-hidroxi-butiril-CoA/acetil-CoA transferasa exógenas (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la succinato semialdehído deshidrogenasa (dependiente de CoA), 4-hidroxi-butanal deshidrogenasa y 4-hidroxi-butiril-

CoA/acetil-CoA transferasa pueden codificarse por genes de *Porphyromonas gingivalis* W83. En una realización adicional, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar butirato cinasa y fosfotransbutirilasa exógenas (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la butirato cinasa y fosfotransbutirilasa pueden codificarse por genes buk1 y ptb de *Clostridium acetobutylicum*.

En aún otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar 4-hidroxi-butiril-CoA reductasa exógena (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la 4-hidroxi-butiril-CoA reductasa puede codificarse por el gen ald de *Clostridium beijerinckii*. Adicionalmente, en una realización de la invención, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar 4-hidroxi-butanal reductasa exógena (véase el ejemplo XIII). Por ejemplo, la 4-hidroxi-butanal reductasa puede codificarse por el gen adh1 de *Geobacillus thermoglucosidasius*. En otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar subunidades de piruvato deshidrogenasa exógena (véase el ejemplo XIV). Por ejemplo, la piruvato deshidrogenasa exógena puede ser insensible a NADH. La subunidad de piruvato deshidrogenasa puede codificarse por el gen lpdA de *Klebsiella pneumoniae*. En una realización particular, los genes de subunidades de piruvato deshidrogenasa del organismo microbiano pueden estar bajo el control de un promotor de piruvato-formiato liasa.

En todavía otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para alterar un gen que codifica para un sistema regulador del control respiratorio aerobio (véase el ejemplo XV). Por ejemplo, la alteración puede ser del gen arcA. Un organismo de este tipo puede comprender además la alteración de un gen que codifica para malato deshidrogenasa. En una realización adicional, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar una citrato sintasa insensible a NADH exógena (véase el ejemplo XV). Por ejemplo, la citrato sintasa insensible a NADH puede codificarse por gltA, tal como un mutante R163L de gltA. En todavía otra realización, el organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar fosfoenolpiruvato carboxicina exógena (véase el ejemplo XVI). Por ejemplo, la fosfoenolpiruvato carboxicina puede codificarse por un gen de fosfoenolpiruvato carboxicina de *Haemophilus influenzae*. Se entiende que pueden usarse de manera similar cepas mostradas a modo de ejemplo en el presente documento para la producción mejorada de BDO, con modificaciones apropiadas, para producir otros productos deseados, por ejemplo, 4-hidroxi-butirato u otros productos deseados divulgados en el presente documento.

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

De manera similar, por ejemplo, con respecto a uno cualquiera o más ácidos nucleicos exógenos introducidos para conferir producción de BDO, un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta biosintética de BDO puede comprender al menos dos ácidos nucleicos exógenos que codifican para enzimas deseadas, tales como la combinación de 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y α -cetoglutarato descarboxilasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y 4-hidroxi-butiril CoA:acetil-CoA transferasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y butirato cinasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa y fosfotransbutirilasa; 4-hidroxi-butiril CoA:acetil-CoA transferasa y aldehído deshidrogenasa; 4-hidroxi-butiril CoA:acetil-CoA transferasa y alcohol deshidrogenasa; 4-hidroxi-butiril CoA:acetil-CoA transferasa y una aldehído/alcohol deshidrogenasa, 4-aminobutirato-CoA transferasa y 4-aminobutiril-CoA transaminasa; 4-aminobutirato cinasa y 4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminación), y similares. Por tanto, se entiende que cualquier combinación de dos o más enzimas de una ruta biosintética puede incluirse en un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la divulgación. De manera similar, se entiende que cualquier combinación de tres o más enzimas de una ruta biosintética puede incluirse en un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la divulgación, por ejemplo, 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, α -cetoglutarato descarboxilasa y 4-hidroxi-butiril CoA:acetil-CoA transferasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, butirato cinasa y fosfotransbutirilasa; 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, 4-hidroxi-butiril CoA:acetil-CoA transferasa

y aldehído deshidrogenasa; 4-hidroxi butiril CoA:acetil-CoA transferasa, aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa; butirato cinasa, fosfotransbutirilasa y una aldehído/alcohol deshidrogenasa; 4-aminobutiril-CoA hidrolasa, 4-aminobutiril-CoA reductasa y 4-amino butan-1-ol transaminasa; 3-hidroxi butiril-CoA deshidrogenasa, 3-hidroxi butiril-CoA deshidratasa y 4-hidroxi butiril-CoA deshidratasa, y similares. De manera similar, cualquier combinación de cuatro, cinco o más enzimas de una ruta biosintética tal como se divulga en el presente documento puede incluirse en un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la divulgación, según se desee, siempre que la combinación de enzimas de la ruta biosintética deseada dé como resultado la producción del producto deseado correspondiente.

Cualquiera de los organismos microbianos que no se producen de manera natural descritos en el presente documento puede cultivarse para producir y/o secretar los productos biosintéticos de la divulgación. Por ejemplo, los productores de 4-HB pueden cultivarse para la producción biosintética de 4-HB. El 4-HB puede aislarse o tratarse tal como se describe a continuación para generar GBL, THF y/o BDO. De manera similar, los productores de BDO pueden cultivarse para la producción biosintética de BDO. El BDO puede aislarse o someterse a tratamientos adicionales para la síntesis química de compuestos de la familia de BDO, tal como se divulga en el presente documento.

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

Por consiguiente, dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que puede producirse un organismo microbiano que no se produce de manera natural que secreta los compuestos biosintetizados de la divulgación cuando se hace crecer sobre una fuente de carbono tal como un hidrato de carbono. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, 4-HB, BDO y cualquiera de los metabolitos intermedios en la ruta de 4-HB, la ruta de BDO y/o las rutas combinadas de 4-HB y BDO. Lo único que se requiere es modificar por ingeniería genética una o más de las actividades enzimáticas mostradas en la figura 1 para lograr la biosíntesis del compuesto o producto intermedio deseado incluyendo, por ejemplo, la inclusión de parte o la totalidad de las rutas biosintéticas de 4-HB y/o BDO. Por consiguiente, la divulgación proporciona un organismo microbiano que no se produce de manera natural que secreta 4-HB cuando se hace crecer sobre un hidrato de carbono, secreta BDO cuando se hace crecer sobre un hidrato de carbono y/o secreta cualquiera de los metabolitos intermedios mostrados en la figura 1 cuando se hace crecer sobre un hidrato de carbono. Los organismos microbianos productores de BDO de la invención pueden iniciar la síntesis, por ejemplo, a partir de succinato, succinil-CoA, α -cetoglutarato, semialdehído succínico, 4-HB, 4-hidroxi butirilfosfato, 4-hidroxi butiril-CoA (4-HB-CoA) y/o 4-hidroxi butiraldehído.

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

También pueden generarse varios compuestos posteriores para los organismos microbianos que no se producen de manera natural productores de 4-HB o BDO de la divulgación. Con respecto a los organismos microbianos productores de 4-HB de la divulgación, 4-HB monomérico y GBL existen en equilibrio en el medio de cultivo. La conversión de 4-HB en GBL puede lograrse eficazmente, por ejemplo, cultivando los organismos microbianos en medio con pH ácido. Un pH inferior o igual a 7,5, en particular de o inferior a pH 5,5, convierte de manera espontánea 4-HB en GBL.

La GBL resultante puede separarse de 4-HB y otros componentes en el cultivo usando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Tales métodos de separación incluyen, por ejemplo, los procedimientos de extracción mostrados a modo de ejemplo en los ejemplos así como métodos que incluyen extracción de líquido-líquido continua, pervaporación, filtración con membrana, separación con membrana, ósmosis inversa, electrodialisis, destilación, cristalización, centrifugación, extracción por filtración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía

de exclusión molecular, cromatografía de adsorción, y ultrafiltración. Todos los métodos anteriores se conocen bien en la técnica. La GBL separada puede purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante destilación.

Otro compuesto posterior que puede producirse a partir de los organismos microbianos que no se producen de manera natural productores de 4-HB de la divulgación incluye, por ejemplo, BDO. Este compuesto puede sintetizarse, por ejemplo, mediante hidrogenación química de GBL. En la técnica se conocen bien las reacciones de hidrogenación química. Un procedimiento a modo de ejemplo incluye la reducción química de 4-HB y/o GBL o una mezcla de estos dos componentes que derivan del cultivo usando un catalizador de hidrogenación heterogéneo u homogéneo junto con hidrógeno, o un agente reductor basado en hidruro usado de manera estequiométrica o catalítica, para producir 1,4-butanodiol.

Otros procedimientos bien conocidos en la técnica son igualmente aplicables para la reacción química anterior e incluyen, por ejemplo, el documento WO n.º 82/03854 (Bradley, *et al.*), que describe la hidrogenólisis de gamma-butirolactona en fase de vapor sobre un catalizador de óxido de cobre y óxido de cinc. La patente británica n.º 1.230.276, que describe la hidrogenación de gamma-butirolactona usando un catalizador de óxido de cobre-óxido de cromo. La hidrogenación se lleva a cabo en fase líquida. También se muestran a modo de ejemplo reacciones discontinuas que tienen altas presiones de reactor totales. Las presiones parciales de reactantes y producto en los reactores están muy por encima de los puntos de rocío respectivos. La patente británica n.º 1.314.126, que describe la hidrogenación de gamma-butirolactona en la fase líquida sobre un catalizador de níquel-cobalto-óxido de torio. Se muestran a modo de ejemplo reacciones discontinuas que tienen altas presiones totales y presiones parciales de componentes muy por encima de los puntos de rocío de componentes respectivos. La patente británica n.º 1.344.557, que describe la hidrogenación de gamma-butirolactona en fase líquida a sobre un catalizador de óxido de cobre-óxido de cromo. Se indica que una fase de vapor o fase mixta que contiene vapor es adecuada en algunos casos. Se muestra a modo de ejemplo un reactor tubular de flujo continuo que usa altas presiones de reactor totales. La patente británica n.º 1.512.751, que describe la hidrogenación de gamma-butirolactona para dar 1,4-butanodiol en fase líquida sobre un catalizador de óxido de cobre-óxido de cromo. Se muestran a modo de ejemplo reacciones discontinuas con altas presiones de reactor totales y, cuando pueden determinarse, presiones parciales de reactantes y producto muy por encima de los puntos de rocío respectivos. La patente estadounidense n.º 4.301.077, que describe la hidrogenación para dar 1,4-butanodiol de gamma-butirolactona sobre un catalizador de Ru-Ni-Co-Zn. La reacción puede realizarse en fase líquida o de gas o en una fase mixta de líquido-gas. Se muestran a modo de ejemplo reacciones en fase líquida de flujo continuo a altas presiones de reactor totales y productividades de reactor relativamente bajas. La patente estadounidense n.º 4.048.196, que describe la producción de 1,4-butanodiol mediante la hidrogenación en fase líquida de gamma-butirolactona sobre un catalizador de óxido de cobre-óxido de cinc. Adicionalmente se muestra a modo de ejemplo un reactor tubular de flujo continuo que funciona a altas presiones de reactor totales y altas presiones parciales de reactantes y producto. Y la patente estadounidense n.º 4.652.685, que describe la hidrogenación de lactonas para dar glicoles.

Un compuesto posterior adicional que puede producirse a partir de los organismos microbianos productores de 4-HB de la divulgación incluye, por ejemplo, THF. Este compuesto puede sintetizarse, por ejemplo, mediante hidrogenación química de GBL. Un procedimiento a modo de ejemplo bien conocido en la técnica aplicable para la conversión de GBL en THF incluye, por ejemplo, la reducción química de 4-HB y/o GBL o una mezcla de estos dos componentes que derivan del cultivo usando un catalizador de hidrogenación heterogéneo u homogéneo junto con hidrógeno, o un agente reductor basado en hidruro usado de manera estequiométrica o catalítica, para producir tetrahidrofurano. Otros procedimientos bien conocidos en la técnica son igualmente aplicables para la reacción química anterior e incluyen, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.686.310, que describe los catalizadores de hidrogenación preparados mediante la ruta de sol-gel de alta área superficial. También se describen procedimientos para la reducción de ácido maleico para dar tetrahidrofurano (THF) y 1,4-butanodiol (BDO) y para la reducción de gamma-butirolactona para dar tetrahidrofurano y 1,4-butanodiol.

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

Pueden realizarse purificación y/o ensayos adecuados para someter a prueba la producción de 4-HB o BDO usando métodos bien conocidos. Pueden hacerse crecer repeticiones adecuadas, tales como cultivos por triplicado, para cada cepa diseñada por ingeniería genética que va a someterse a prueba. Por ejemplo, puede monitorizarse la formación de productos y subproductos en el huésped de producción diseñado por ingeniería genética. 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-espectrometría de masas) y CL-EM (cromatografía de líquidos-espectrometría de masas) u otros métodos analíticos adecuados usando procedimientos rutinarios bien conocidos en la técnica. También puede someterse a prueba la liberación de producto en el caldo de fermentación con el sobrenadante de cultivo. Pueden cuantificarse subproductos y 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. También pueden someterse a ensayo las actividades de enzimas o

proteínas individuales a partir de las secuencias de ADN exógenas usando métodos bien conocidos en la técnica.

El producto 4-HB o BDO 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 la extracción de líquido-líquido continua, pervaporación, filtración con membrana, separación con membrana, osmosis inversa, electrodiálisis, destilación, cristalización, centrifugación, extracción por filtración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de adsorción, y ultrafiltración. Todos los métodos anteriores se conocen bien en la técnica.

La divulgación proporciona además un método de fabricación de 4-HB. El método incluye fermentar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta biosintética de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxibutanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, α -cetoglutarato descarboxilasa, o glutamato descarboxilasa en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) monomérico, comprendiendo el procedimiento la fermentación de alimentación discontinua y separación discontinua; fermentación de alimentación discontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua.

El cultivo y las hidrogenaciones químicas descritos anteriormente también pueden ampliarse a escala y hacerse crecer de manera continua para la fabricación de 4-HB, GBL, BDO y/o THF. Los procedimientos de crecimiento a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, fermentación de alimentación discontinua y separación discontinua; fermentación de alimentación discontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procedimientos se conocen bien en la técnica. Emplear los productores de 4-HB permite simultáneamente la biosíntesis de 4-HB y la conversión química para dar GBL, BDO y/o THF empleando los procedimientos de hidrogenación anteriores de manera simultánea con métodos de cultivos continuos tales como fermentación. En la técnica también se conocen bien otros procedimientos de hidrogenación en la técnica y pueden aplicarse igualmente a los métodos de la invención.

Los procedimientos de fermentación son particularmente útiles para la producción biosintética de cantidades comerciales de 4-HB y/o BDO. Generalmente, y como con los procedimientos de cultivo no continuo, la producción continua y/o casi continua de 4-HB o BDO incluirá cultivar un organismo productor de 4-HB o BDO que no se produce de manera natural de la divulgación con nutrientes suficientes y medio 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 o más semanas y hasta varios meses. Alternativamente, pueden cultivarse organismos de la invención durante horas, si es adecuado para una aplicación particular. Debe entenderse que las condiciones de cultivo continuo y/o casi continuo también pueden incluir todos los intervalos de tiempo entre estos periodos a modo de ejemplo. Además, se entiende que el tiempo de cultivo del organismo microbiano de la invención es durante un periodo de tiempo suficiente para producir una cantidad suficiente de producto para un fin deseado.

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

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

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

Por tanto, adicionalmente se divulga un método de fabricación de γ -butirolactona (GBL), tetrahydrofurano (THF) o 1,4-butanodiol (BDO). El método incluye fermentar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene rutas biosintéticas de ácido 4-hidroxibutanoico (4-HB) y/o 1,4-butanodiol (BDO), las rutas comprenden al

menos un ácido nucleico exógeno que codifica para 4-hidroxi-butanoato deshidrogenasa, semialdehído succínico deshidrogenasa independiente de CoA, succinil-CoA sintetasa, semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxi-butirato:CoA transferasa, glutamato:semialdehído succínico transaminasa, α -cetoglutarato descarboxilasa, glutamato descarboxilasa, 4-hidroxi-butanoato cinasa, fosfotransbutirilasa, 1,4-butanodiol semialdehído deshidrogenasa independiente de CoA, 1,4-butanodiol semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA, 1,4-butanodiol alcohol deshidrogenasa independiente de CoA o 1,4-butanodiol alcohol deshidrogenasa dependiente de CoA, en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir 1,4-butanodiol (BDO), GBL o THF, comprendiendo la fermentación fermentación de alimentación discontinua y separación discontinua; fermentación de alimentación discontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Además de la biosíntesis de 4-HB, BDO y otros productos tal como se describe en el presente documento, los organismos microbianos que no se producen de manera natural y métodos de la divulgación también pueden usarse en diversas combinaciones entre sí y con otros organismos microbianos y métodos bien conocidos en la técnica para lograr la biosíntesis de producto por otras rutas. Por ejemplo, una alternativa para producir BDO distinta del uso de los productores de 4-HB y etapas químicas o distinta del uso del productor de BDO directamente es mediante la adición de otro organismo microbiano capaz de convertir 4-HB o un producto de 4-HB mostrado a modo de ejemplo en el presente documento en BDO.

Un procedimiento de este tipo incluye, por ejemplo, la fermentación de un organismo microbiano productor de 4-HB de la divulgación para producir 4-HB, tal como se describió anteriormente y a continuación. Entonces puede usarse el 4-HB como sustrato para un segundo organismo microbiano que convierte 4-HB, por ejemplo, en BDO, GBL y/o THF. Puede añadirse directamente el 4-HB a otro cultivo del segundo organismo o pueden eliminarse del cultivo original de productores de 4-HB estos organismos microbianos, por ejemplo, mediante separación celular, y después puede usarse la adición posterior del segundo organismo al caldo de fermentación para producir el producto final sin etapas de purificación intermedias. Un segundo organismo a modo de ejemplo que tiene la capacidad para utilizar de manera bioquímica 4-HB como sustrato para su conversión en BDO es, por ejemplo, *Clostridium acetobutylicum* (véase, por ejemplo, Jewell *et al.*, Current Microbiology, 13:215-19 (1986)).

En otras realizaciones, los organismos microbianos que no se producen de manera natural y métodos de la divulgación pueden ensamblarse en una amplia variedad de rutas secundarias para lograr la biosíntesis, por ejemplo, de 4-HB y/o BDO tal como se describe. En estas realizaciones, las rutas biosintéticas para un producto deseado de la invención pueden separarse en diferentes organismos microbianos y los diferentes organismos microbianos pueden cultivarse conjuntamente para producir el producto final. En un esquema biosintético 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 BDO puede lograrse tal como se describió anteriormente construyendo un organismo microbiano que contiene rutas biosintéticas para la conversión del producto intermedio de una ruta en el producto intermedio de otra ruta o en el producto, por ejemplo, un sustrato tal como succinato endógeno a través de 4-HB para dar el producto final BDO. Alternativamente, también puede producirse BDO de manera biosintética a partir de organismos microbianos mediante el cultivo conjunto o la fermentación conjunta usando dos organismos en el mismo recipiente. Un primer organismo microbiano es un productor de 4-HB con genes para producir 4-HB a partir de ácido succínico, y un segundo organismo microbiano es un productor de BDO con genes para convertir 4-HB en BDO.

Dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que existe una amplia variedad de combinaciones y permutaciones para los organismos microbianos que no se producen de manera natural y métodos de la invención junto con otros organismos microbianos, con el cultivo conjunto de otros organismos microbianos que no se producen de manera natural que tienen rutas secundarias y con combinaciones de otros procedimientos químicos y/o bioquímicos bien conocidos en la técnica para producir productos 4-HB, BDO, GBL y THF de la divulgación.

Para generar productores mejores, puede usarse el modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. También puede usarse el modelado para diseñar 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 n.º 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento celular del desplazamiento del metabolismo hacia una producción más eficaz de BDO.

Un método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la biosíntesis de un producto deseado es la infraestructura computacional OptKnock (Burgard *et al.*, Biotechnol Bioeng, 84: 647-657 (2003)). OptKnock es un programa de modelado y simulación metabólicos que sugiere estrategias de alteración o delección génica que dan como resultado microorganismos genéticamente estables que sobreproducen el producto objetivo. Específicamente, la infraestructura examina la red metabólica y/o bioquímica completa de un microorganismo con el fin de sugerir manipulaciones genéticas que fuerzan que el producto bioquímico deseado se convierta en un subproducto obligatorio del crecimiento celular. Acoplando la producción de producto bioquímico con el crecimiento celular a través de delecciones génicas estratégicamente colocadas u otra alteración génica funcional, las presiones de selección de crecimiento impuestas sobre las cepas modificadas por ingeniería genética tras largos

periodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción de producto bioquímico obligatoria acoplada con el crecimiento. Por último, cuando se construyen delecciones génicas hay una posibilidad despreciable de que las cepas diseñadas vuelvan a sus estados de tipo natural porque los genes seleccionados por OptKnock se eliminan completamente del genoma. Por tanto, esta metodología computacional puede o bien usarse para identificar rutas alternativas que conducen a la biosíntesis de un producto deseado o bien usarse en relación con los organismos microbianos que no se producen de manera natural para la optimización adicional de la 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 infraestructura de modelos y métodos que incorporan limitaciones particulares a modelos de análisis de equilibrio de flujos (FBA). Estas limitaciones incluyen, por ejemplo, información cinética cualitativa, información reguladora cualitativa y/o datos experimentales de microalineamientos de ADN. OptKnock también calcula soluciones a diversos problemas metabólicos, por ejemplo, estrechando los límites de flujo derivados a través de modelos de equilibrio de flujos y posteriormente investigando los límites de rendimiento de redes metabólicas en presencia de adiciones o delecciones génicas. La infraestructura computacional OptKnock permite la construcción de formulaciones de modelo que permiten una consulta eficaz de los límites de rendimiento de redes metabólicas y proporciona métodos para solucionar los problemas de programación lineal en enteros mixta resultantes. Los métodos de modelado y simulación metabólicos denominados en el presente documento OptKnock se describen, por ejemplo, en la publicación estadounidense 202/0168654, presentada el 10 de enero de 2002, en la patente internacional n.º PCT/US02/00660, presentada el 10 de enero de 2002, y en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 11/891.602, presentada el 10 de agosto de 2007.

Otro método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la producción biosintética de un producto es un sistema de modelado y simulación metabólicos denominado SimPheny[®]. Este método y sistema computacional se describe, por ejemplo, en la publicación estadounidense 2003/023218, presentada el 14 de junio de 2002, y en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US03/18838, presentada el 13 de junio de 2003. SimPheny[®] es un sistema computacional que puede usarse para producir un modelo de red *in silico* y para simular el flujo de masa, energía o carga a través de las reacciones químicas de un sistema biológico para definir un espacio de solución que limita todas y cada una de las posibles funcionalidades de las reacciones químicas en el sistema, determinando de ese modo un intervalo de actividades permitidas para el sistema biológico. Este enfoque se denomina modelado basado en limitaciones porque el espacio de solución se define por limitaciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas así como limitaciones de capacidad y termodinámica de reacción asociadas con flujos máximos a través de las reacciones. Puede consultarse el espacio definido por estas limitaciones para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos.

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

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

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

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que deben alterarse con el fin de lograr la producción de un producto deseado se implementa en la célula o el organismo diana mediante alteración funcional de al menos un gen que

codifica para cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio particularmente útil para lograr la alteración funcional del conjunto de reacciones es mediante delección de cada gen codificante. Sin embargo, en algunos casos, puede ser beneficioso alterar la reacción mediante otras aberraciones genéticas incluyendo, por ejemplo, mutación, delección de regiones reguladoras tales como promotores o sitios de unión en cis para factores reguladores, o mediante truncamiento de la secuencia codificante en cualquiera de varias ubicaciones. Estas últimas aberraciones, que dan como resultado menos que la delección total del conjunto de genes pueden ser útiles, por ejemplo, cuando se desean evaluaciones rápidas del acoplamiento de un producto o cuando es menos probable que se produzca reversión genética.

Para identificar soluciones productivas adicionales al problema de OptKnock de dos niveles descrito anteriormente que conducen a conjuntos adicionales de reacciones para alterar o modificaciones metabólicas que pueden dar como resultado la biosíntesis, incluyendo la biosíntesis acoplada con el crecimiento de un producto deseado, puede implementarse un método de optimización, denominado cortes en enteros. Este método avanza resolviendo de manera iterativa el problema de OptKnock mostrado a modo de ejemplo anteriormente con la incorporación de una limitación adicional denominada corte en enteros en cada iteración. Las limitaciones de corte en enteros impiden eficazmente que el procedimiento de solución escoja exactamente el mismo conjunto de reacciones identificado en una iteración anterior que obligatoriamente acopla la biosíntesis de producto con el crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica acoplada con el crecimiento anteriormente identificada especifica las reacciones 1, 2 y 3 para su alteración, entonces la siguiente limitación impide que se consideren simultáneamente las mismas reacciones en soluciones posteriores. El método de corte en enteros se conoce bien en la técnica 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 infraestructura computacional OptKnock para el modelado y la simulación metabólicos, el método de corte en enteros de reducción de la redundancia en análisis computacional iterativo también puede aplicarse con otras infraestructuras computacionales bien conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, SimPheny®.

Los métodos mostrados a modo de ejemplo 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 objetivo con el crecimiento de la célula o el organismo diseñado por ingeniería genética 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 la ruta biosintética y/o alteración funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, alteración mediante delección génica.

Tal como se comentó anteriormente, la metodología OptKnock se desarrolló con la premisa de que las redes microbianas mutantes pueden evolucionar hacia sus fenotipos de crecimiento máximo computacionalmente predichos cuando se someten a largos periodos de selección de crecimiento. Dicho de otro modo, el enfoque hace uso de la capacidad de un organismo para optimizarse a sí mismo bajo presiones de selección. La infraestructura OptKnock permite la enumeración exhaustiva de combinaciones de delecciones génicas que fuerzan un acoplamiento entre la producción bioquímica y el crecimiento celular basándose en la estequiometría de red. La identificación de desactivaciones génicas/de reacción óptimas requiere solucionar un problema de optimización de dos niveles que elige el conjunto de reacciones activas de 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 mostró anteriormente a modo de ejemplo 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 n.º 7.127.379. Tal como se divulga en el presente documento, la infraestructura matemática OptKnock puede aplicarse para localizar con precisión delecciones génicas que conducen a la producción acoplada al 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 al crecimiento, puede implementarse una técnica de optimización, denominada cortes en enteros. Esto conlleva resolver de manera iterativa el problema de OptKnock con la incorporación de una limitación adicional denominada corte en enteros en cada iteración, tal como se comentó anteriormente.

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

fermentación continua sin someterse a las presiones de selección negativas.

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

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

Cualquiera de los organismos microbianos que no se producen de manera natural descritos en el presente documento pueden cultivarse para producir y/o secretar los productos biosintéticos de la invención. Por ejemplo, los productores de BDO pueden cultivarse para la producción biosintética de BDO.

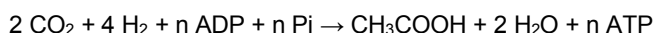
Para la producción de BDO, se cultivan las cepas recombinantes en un medio con fuente de carbono y otros nutrientes esenciales. Es altamente deseable mantener condiciones anaerobias en el fermentador para reducir el coste del procedimiento global. Tales condiciones pueden obtenerse, por ejemplo, burbujeando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

Si se desea, puede mantenerse el pH del medio a un pH deseado, en particular pH neutro, tal como un pH de aproximadamente 7 mediante adición de una base, tal como NaOH u otras bases, o ácido, según se necesite para mantener el medio de cultivo a un pH deseado. La tasa de crecimiento puede determinarse midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la tasa 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 mostradas anteriormente a modo de ejemplo, los organismos microbianos productores de BDO de la invención también pueden modificarse para el crecimiento con gas de síntesis como fuente de carbono. En esta realización específica, una o más proteínas o enzimas se expresan en los organismos productores de BDO para proporcionar una ruta metabólica para la utilización de gas de síntesis u otra fuente de carbono gaseosa.

El sintegás, también conocido como gas de síntesis o gas sintético, es el principal producto de gasificación de carbón y de materiales carbonosos tales como materiales de biomasa, incluyendo residuos y cosechas agrícolas. El gas de síntesis es una mezcla principalmente de H₂ y CO y puede obtenerse a partir de la gasificación de cualquier materia prima orgánica, incluyendo, pero sin limitarse a, carbón, aceite de hulla, gas natural, biomasa y materia orgánica residual. La gasificación se lleva a cabo generalmente con una alta razón de combustible con respecto a oxígeno. Aunque incluye en gran medida H₂ y CO, el gas de síntesis también puede incluir CO₂ y otros gases en menores cantidades. Por tanto, el gas de síntesis proporciona una fuente rentable de carbono gaseoso tal como CO y, adicionalmente, CO₂.

La ruta de Wood-Ljungdahl cataliza la conversión de CO y H₂ en acetil-CoA y otros productos tales como acetato. Los organismos capaces de usar CO y gas de síntesis generalmente también tienen la capacidad de usar CO₂ y mezclas de CO₂/H₂ mediante el mismo conjunto básico de enzimas y transformaciones abarcadas por la ruta de Wood-Ljungdahl. La conversión dependiente de H₂ de CO₂ en acetato por microorganismos se reconoció mucho antes de revelarse que los mismos organismos también podían usar CO y que estaban implicadas las mismas rutas. Se ha mostrado que muchos acetógenos crecen en presencia de CO₂ y producen compuestos tales como acetato siempre que esté presente hidrógeno para suministrar los equivalentes reductores necesarios (véase, por ejemplo, Drake, Acetogenesis, págs. 3-60 Chapman and Hall, Nueva York, (1994)). Esto puede resumirse mediante la siguiente ecuación:



Por tanto, los microorganismos que no se producen de manera natural que presentan la ruta de Wood-Ljungdahl también pueden usar mezclas de CO₂ y H₂ para la producción de acetil-CoA y otros productos deseados.

La ruta de Wood-Ljungdahl se conoce bien en la técnica y consiste en 12 reacciones que pueden separarse en dos ramas: (1) rama de metilo y (2) rama de carbonilo. La rama de metilo convierte gas de síntesis en metil-tetrahidrofolato (metil-THF) mientras que la rama de carbonilo convierte metil-THF en acetil-CoA. Las reacciones en

la rama de metilo se catalizan en orden por las siguientes enzimas o proteínas: ferredoxina oxidoreductasa, formiato deshidrogenasa, formiltetrahidrofolato sintetasa, meteniltetrahidrofolato ciclodeshidratasa, metilenotetrahidrofolato deshidrogenasa y metilenotetrahidrofolato reductasa. Las reacciones en la rama de carbonilo se catalizan en orden por las siguientes enzimas o proteínas: metiltetrahidrofolato:proteína corrinóide metiltransferasa (por ejemplo, AcsE), proteína hierro-azufre corrinóide, proteína de ensamblaje de proteína níquel (por ejemplo, AcsF), ferredoxina, acetil-CoA sintasa, monóxido de carbono deshidrogenasa y proteína de ensamblaje de proteína níquel (por ejemplo, CooC). Siguiendo las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en el presente documento para la introducción de un número suficiente de ácidos nucleicos codificantes para generar una ruta de BDO, los expertos en la técnica entenderán que también puede realizarse el mismo diseño por ingeniería genética con respecto a la introducción de al menos los ácidos nucleicos que codifican para las enzimas o proteínas de Wood-Ljungdahl ausentes en el organismo huésped. Por tanto, la introducción de uno o más ácidos nucleicos codificantes en los organismos microbianos de la invención de manera que el organismo modificado contiene la ruta de Wood-Ljungdahl completa conferirá la capacidad de uso de gas de síntesis.

Por consiguiente, dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que puede producirse un organismo microbiano que no se produce de manera natural que secreta los compuestos biosintetizados de la invención cuando se hace crecer con una fuente de carbono tal como un hidrato de carbono. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, BDO y cualquiera de los metabolitos intermedios en la ruta de BDO. Lo único que se requiere es introducir por ingeniería genética una o más de las actividades de enzimas o proteínas requeridas para lograr la biosíntesis del compuesto deseado o producto intermedio incluyendo, por ejemplo, la inclusión de algunas o todas de las rutas biosintéticas de BDO. Por consiguiente, la invención proporciona un organismo microbiano que no se produce de manera natural que produce y/o secreta BDO cuando se hace crecer con un hidrato de carbono u otra fuente de carbono y produce y/o secreta cualquiera de los metabolitos intermedios mostrados en la ruta de BDO cuando se hace crecer con un hidrato de carbono u otra fuente de carbono. Los organismos microbianos productores de BDO de la invención pueden iniciar la síntesis a partir de un producto intermedio en una ruta de BDO, tal como se divulga en el presente documento.

Para generar mejores productores, puede usarse el modelado metabólico para optimizarse las condiciones de crecimiento. También puede usarse el modelado para diseñar 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 n.º 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento celular del desplazamiento del metabolismo hacia una producción más eficaz de BDO.

Un método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la biosíntesis de un producto deseado es la infraestructura computacional OptKnock (Burgard *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)). OptKnock es un programa de modelado y simulación metabólico que sugiere estrategias de delección génica que dan como resultado microorganismos genéticamente estables que sobreproducen el producto objetivo. Específicamente, la infraestructura examina la red metabólica y/o bioquímica completa de un microorganismo con el fin de sugerir manipulaciones genéticas que fuerzan que el producto bioquímico deseado se convierta en un subproducto obligatorio del crecimiento celular. Acoplando la producción bioquímica con el crecimiento celular mediante delecciones génicas estratégicamente ubicadas u otra alteración génica funcional, las presiones de selección de crecimiento impuestas sobre las cepas diseñadas por ingeniería genética después de largos periodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción de producto bioquímico obligatoria acoplada al crecimiento. Por último, cuando se construyen delecciones génicas existe una posibilidad despreciable de que las cepas diseñadas vuelvan a sus estados de tipo natural porque los genes seleccionados por OptKnock deben eliminarse completamente del genoma. Por tanto, esta metodología computacional puede usarse o bien para identificar rutas alternativas que conducen a la biosíntesis de un producto deseado o bien usarse en relación con los organismos microbianos que no se producen de manera natural para una optimización adicional de la 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 infraestructura de modelos y métodos que incorporan limitaciones particulares en modelos de análisis de equilibrio de flujos (FBA). Estas limitaciones 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 mediante modelos de equilibrio de flujos y analizando posteriormente con sonda los límites de rendimiento de redes metabólicas en presencia de adiciones o delecciones génicas. La infraestructura computacional OptKnock permite la construcción de formulaciones de modelo que permiten una consulta eficaz de los límites de rendimiento de redes metabólicas y proporciona métodos para resolver los problemas de programación lineal en enteros mixta resultante. Los métodos de modelado y simulación metabólicos denominados en el presente documento OptKnock se describen, por ejemplo, en la publicación estadounidense 2002/0168654, presentada el 10 de enero de 2002, en la patente internacional n.º PCT/US02/00660, presentada el 10 de enero de 2002, y en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 11/891.602, presentada el 10 de agosto de 2007.

Otro método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la producción biosintética de un producto es un sistema de modelado y simulación metabólico denominado SimPheny[®]. Este método y sistema computacional se describe, por ejemplo, en la publicación estadounidense 2003/0233218, presentada el 14 de junio de 2002, y en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US03/18838, presentada en 13 de junio de 2003. SimPheny[®] es un sistema computacional que puede usarse para producir un modelo de red *in silico* y para estimular el flujo de masa, energía o carga a través de las reacciones químicas de un sistema biológico para definir un espacio de solución que contiene todas y cada una de las posibles funcionalidades de las reacciones químicas en el sistema, determinando así una gama de actividades permitidas para el sistema biológico. Este enfoque se denomina modelado basado en limitaciones porque el espacio de solución está definido por limitaciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas así como limitaciones de capacidad y termodinámica de reacción asociadas con flujos máximos a través de reacciones. El espacio definido por estas limitaciones puede consultarse para determinar las capacidades de fenotipo y el comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos.

Estos enfoques computacionales concuerdan 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 limitado mediante limitaciones fundamentales a las que todos los sistemas vivos deben enfrentarse. Por tanto, la estrategia de modelado basada en limitaciones adopta estas realidades generales. Además, la capacidad para imponer restricciones adicionales sobre un modelo de red estrechando las limitaciones da como resultado una reducción del tamaño del espacio de solución, potenciando así la precisión con la que pueden predecirse el fenotipo o rendimiento fisiológico.

Dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica serán capaces de aplicar diversas infraestructuras computacionales para el modelado y simulación metabólicos para diseñar e implementar biosíntesis de un compuesto deseado en organismos huésped microbianos. Tales métodos de modelado y simulación metabólicos incluyen, por ejemplo, los sistemas computacionales mostrados anteriormente a modo de ejemplo como SimPheny[®] y OptKnock. Para ilustración de la invención, en el presente documento se describen algunos métodos con referencia a la infraestructura de cálculo OptKnock para modelado y simulación. Los expertos en la técnica sabrán cómo aplicar la identificación, diseño e implementación de las alteraciones metabólicas usando OptKnock a cualquier otro método e infraestructura computacional de modelado y simulación metabólicos bien conocidos en la técnica.

Los métodos descritos anteriormente proporcionarán un conjunto de reacciones metabólicas para alterar. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto o modificación metabólica puede dar como resultado un producto deseado como 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 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 genes correspondientes que codifican para las enzimas que participan en cada reacción es generalmente un procedimiento automatizado, que se logra mediante correlación de las reacciones con una base de datos de reacción que tiene una relación entre enzimas y genes codificantes.

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que tienen que alterarse con el fin de lograr la producción de un producto deseado se implementa en la célula u organismo objetivo mediante alteración funcional de al menos un gen que codifica para cada reacción metabólica dentro del conjunto. Un medio particularmente útil para lograr la alteración funcional del conjunto de reacción es mediante delección de cada gen codificante. Sin embargo, en algunos casos, puede resultar beneficioso alterar la reacción mediante otras aberraciones genéticas incluyendo, por ejemplo, mutación, delección de regiones reguladoras tales como promotores o sitios de unión en *cis* para factores reguladores, o mediante truncamiento de la secuencia codificante en cualquiera de varias ubicaciones. Estas últimas aberraciones, que dan como resultado una delección 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 una reversión génica.

Para identificar soluciones productivas adicionales al problema de OptKnock de dos niveles descrito anteriormente que conducen a conjuntos adicionales de reacciones que van a alterarse o modificaciones metabólicas que pueden dar como resultado la biosíntesis, incluyendo biosíntesis acoplada al crecimiento, de un producto deseado, puede implementarse un método de optimización, denominado corte en enteros. Este método avanza resolviendo de manera iterativa el problema de OptKnock mostrado anteriormente a modo de ejemplo con la incorporación de una limitación adicional denominada corte en enteros en cada iteración. Las limitaciones de corte en enteros impiden eficazmente que el procedimiento de solución elija exactamente el mismo conjunto de reacciones identificado en cualquier iteración anterior que acopla obligatoriamente la biosíntesis de producto al crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica acoplada al crecimiento anteriormente identificada especifica las reacciones 1, 2 y 3 para su alteración, entonces las siguientes limitaciones impiden que se consideren simultáneamente las mismas reacciones en soluciones posteriores. El método de corte en 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 infraestructura computacional OptKnock para el

modelado y la simulación metabólicos, el método de corte en enteros de reducir la redundancia en el análisis computacional iterativo también puede aplicarse con otras infraestructuras computacionales bien conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, SimPheny®.

Los métodos mostrados a modo de ejemplo 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 objetivo con el crecimiento de la célula o el organismo diseñado por ingeniería genética para albergar las alteraciones génicas 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, la adición de una o más enzimas de la ruta biosintética y/o la alteración funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, la alteración mediante delección génica.

Tal como se comentó anteriormente, la metodología OptKnock se desarrolló con la premisa de que las redes microbianas mutantes pueden evolucionar hacia sus fenotipos de crecimiento máximo computacionalmente predichos cuando se someten a largos periodos de selección de crecimiento. Dicho de otro modo, el enfoque hace uso de la capacidad de un organismo para optimizarse a sí mismo bajo presiones de selección. La infraestructura OptKnock permite la enumeración exhaustiva de combinaciones de delecciones génicas que fuerzan un acoplamiento entre la producción bioquímica y el crecimiento celular basándose en la estequiometría de la red. La identificación de desactivaciones génicas/de reacción óptimas requiere la solución de un problema de optimización de dos niveles que elige el conjunto de reacciones activas de manera que una solución de crecimiento óptima 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* de metabolismo de *E. coli* para identificar genes esenciales para rutas metabólicas tal como se mostró anteriormente a modo de ejemplo 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 n.º 7.127.379. Tal como se divulga en el presente documento, la infraestructura matemática OptKnock puede aplicarse para localizar con precisión delecciones génicas que conducen a la producción acoplada al 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 disoluciones significativas, es decir, todos los conjuntos de desactivaciones que conducen a la formación de producción acoplada al crecimiento, puede implementarse una técnica de optimización, denominada corte en enteros. Esto conlleva resolver de manera iterativa el problema de OptKnock con la incorporación de una limitación adicional denominada corte en enteros en cada iteración, tal como se comentó anteriormente.

EJEMPLO I

Biosíntesis de ácido 4-hidroxi-butanoico

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

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

Puede producirse 4-HB en dos etapas de reducción enzimática a partir de succinato, un metabolito central del ciclo de TCA, con semialdehído succínico como producto intermedio (figura 1). La primera de estas enzimas, semialdehído succínico deshidrogenasa, es nativa para muchos organismos incluyendo *E. coli*, en el que se han encontrado enzimas dependientes tanto de NADH como de NADPH (Donnelly y Cooper, Eur. J. Biochem. 113:555-561 (1981); Donnelly y Cooper, J. Bacteriol. 145:1425-1427 (1981); Marek y Henson, J. Bacteriol. 170:991-994 (1988)). También hay pruebas que apoyan la actividad semialdehído succínico deshidrogenasa en *S. cerevisiae* (Ramos *et al.*, Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985)), y se ha identificado un gen supuesto mediante homología de secuencia. Sin embargo, la mayoría de los informes indican que esta enzima avanza en el sentido de síntesis de succinato, tal como se muestra en la figura 1 (Donnelly y Cooper, citado anteriormente; Lutke-Eversloh y Steinbuchel, FEMS Microbiol. Lett. 181:63-71 (1999)), participando en la ruta de degradación de 4-HB y gamma-aminobutirato. El semialdehído succínico también se produce de manera nativa por determinados organismos microbianos tales como *E. coli* a través del producto intermedio del ciclo de TCA α -cetoglutarato por medio de la

acción de dos enzimas: glutamato:semialdehído succínico transaminasa y glutamato descarboxilasa. Una ruta alternativa, usada por el anaerobio obligado *Clostridium kluyveri* para degradar succinato, activa succinato para dar succinil-CoA, convirtiendo luego succinil-CoA en semialdehído succínico usando una semialdehído succínico deshidrogenasa alternativa que se sabe que funciona en este sentido (Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993)). Sin embargo, esta ruta tiene el coste energético de que se requiere ATP para convertir succinato en succinil-CoA.

La segunda enzima de la ruta, 4-hidroxiбутаноato deshidrogenasa, no es nativa para *E. coli* o levadura pero se encuentra en diversas bacterias tales como *C. kluyveri* y *Ralstonia eutropha* (Lutke-Eversloh y Steinbuchel, citado anteriormente; Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996); Valentin *et al.*, Eur. J. Biochem. 227:43-60 (1995); Wolff y Kenealy, Protein Expr. Purif. 6:206-212 (1995)). Se sabe que estas enzimas son dependientes de NADH, aunque también existen formas dependientes de NADPH. Una ruta adicional para dar 4-HB a partir de alfa-cetoglutarato se demostró en *E. coli* dando como resultado la acumulación de poli(ácido 4-hidroxiбутírico) (Song *et al.*, Wei Sheng Wu Xue. Bao. 45:382-386 (2005)). La cepa recombinante requería la sobreexpresión de tres genes heterólogos, PHA sintasa (*R. eutropha*), 4-hidroxiбутирато deshidrogenasa (*R. eutropha*) y 4-hidroxiбутирато:CoA transferasa (*C. kluyveri*), junto con dos genes de *E. coli* nativos: glutamato:semialdehído succínico transaminasa y glutamato descarboxilasa. Las etapas 4 y 5 en la figura 1 pueden llevarse a cabo alternativamente mediante una alfa-cetoglutarato descarboxilasa tal como la identificada en *Euglena gracilis* (Shigeoka *et al.*, Biochem. J. 282(Pt2):319-323 (1992); Shigeoka y Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991); Shigeoka y Nakano, Biochem J. 292(Pt 2):463-467 (1993)). Sin embargo, esta enzima no se ha aplicado previamente para tener un impacto en la producción de 4-HB o polímeros relacionados en ningún organismo.

Se exploraron las capacidades de producción microbiana de 4-hidroxiбутирато en dos microbios, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, usando modelos metabólicos *in silico* de cada organismo. Las posibles rutas para dar 4-HB avanzan a través de productos intermedios de succinato, succinil-CoA o alfa-cetoglutarato tal como se muestra en la figura 1.

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

La ruta desde succinil-CoA hasta 4-hidroxiбутирато se describió en la patente estadounidense n.º 6.117.658 como parte de un procedimiento para preparar polihidroxiалcanoatos que comprenden unidades monoméricas de 4-hidroxiбутирато. *Clostridium kluyveri* es un organismo de ejemplo que se sabe que presenta actividad semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA (Sohling y Gottschalk, citado anteriormente; Sohling y Gottschalk, citado anteriormente). En este estudio, se supone que esta enzima, de *C. kluyveri* u otro organismo, se expresa en *E. coli* o *S. cerevisiae* junto con una 4-HB deshidrogenasa no nativa o heteróloga para completar la ruta desde succinil-CoA hasta 4-HB. Se demostró la ruta desde alfa-cetoglutarato hasta 4-HB en *E. coli* dando como resultado la acumulación de poli(ácido 4-hidroxiбутírico) hasta el 30% del peso celular seco (Song *et al.*, citado anteriormente). Como *E. coli* y *S. cerevisiae* presentan de manera nativa o endógena tanto glutamato:semialdehído succínico transaminasa como glutamato descarboxilasa (Coleman *et al.*, J. Biol. Chem. 276:244-250 (2001)), la ruta desde AKG hasta 4-HB puede completarse en ambos organismos suponiendo sólo que está presente una 4-HB deshidrogenasa no nativa.

EJEMPLO II

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

Este ejemplo ilustra la construcción y producción biosintética de 4-HB y BDO a partir de organismos microbianos. En el presente documento se divulgan rutas para 4-HB y BDO.

Además, hay varias enzimas alternativas que pueden usarse en la ruta descrita anteriormente. La enzima nativa o endógena para la conversión de succinato en succinil-CoA (etapa 1 en la figura 1) puede reemplazarse por una CoA transferasa tal como la codificada por el gen *cat1* de *C. kluyveri* (Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212: 121-127 (1993)), que funciona de una manera similar a la etapa 9. Sin embargo, la producción de acetato por esta enzima puede no ser óptima, ya que puede secretarse en vez de convertirse de nuevo en acetyl-CoA. En este sentido, también puede ser beneficioso eliminar la formación de acetato en la etapa 9. Como alternativa a esta CoA transferasa, puede emplearse un mecanismo en el que en primer lugar se fosforila el 4-HB mediante ATP y luego se convierte en el derivado de CoA, de manera similar a la ruta de acetato cinasa/fosfotransacetilasa en *E. coli* para la

conversión de acetato en acetil-CoA. El coste neto de esta ruta es un ATP, que es lo mismo que se requiere para regenerar acetil-CoA a partir de acetato. Se sabe que las enzimas fosfotransbutirilasa (ptb) y butirato cinasa (bk) llevan a cabo estas etapas en las moléculas no hidroxiladas para la producción de butirato en *C. acetobutylicum* (Cary *et al.*, Appl Environ Microbiol 56:1576-1583 (1990); Valentine, R. C. y R. S. Wolfe, J Biol Chem. 235:1948-1952 (1960)). Estas enzimas son reversibles, permitiendo que la síntesis avance en el sentido de 4-HB.

También puede producirse BDO por medio de α -cetoglutarato además, o en lugar, de a través de succinato. Tal como se describió anteriormente, y se muestra a modo de ejemplo adicionalmente a continuación, una ruta para lograr la biosíntesis del producto es con la producción de semialdehído succínico por medio de α -cetoglutarato usando las enzimas endógenas (figura 1, etapas 4-5). Una alternativa es usar una α -cetoglutarato descarboxilasa que puede realizar esta conversión en una etapa (figura 1, etapa 8; Tian *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 102:10670-10675 (2005)).

Para la construcción de diferentes cepas de organismos microbianos productores de BDO, se ensambló una lista de genes aplicables para su corroboración. En resumen, se identificaron uno o más genes dentro de las rutas biosintéticas de 4-HB y/o BDO para cada etapa de la ruta de producción de BDO completa mostrada en la figura 1, usando recursos bibliográficos disponibles, la base de datos genéticos del NCBI y búsquedas de homología. Los genes clonados y evaluados en este estudio se presentan a continuación en la tabla 6, junto con las menciones de URL y referencias apropiadas para la secuencia de polipéptido. Tal como se comenta adicionalmente a continuación, algunos genes se sintetizaron para la optimización de codones mientras que otros se clonaron por medio de PCR a partir del ADN genómico del organismo nativo o de tipo natural. Para algunos genes se usaron ambos enfoques, y en este caso los genes nativos se indican mediante un sufijo "n" en el número de identificación de gen cuando se usan en un experimento. Obsérvese que sólo difieren las secuencias de ADN; las proteínas son idénticas.

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

Número de ID de gen	Número de reacción (figura 1)	Nombre del gen	Organismo fuente	Nombre de la enzima	Enlace a la secuencia de la proteína	Referencia
0001	9	Cat2	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1228100	1
0002	12/13	adhE	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=15004739	2
0003	12/13	adhE2	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_149325.1	2
0004	1	Cat1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Succinato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1228100	1
0008	6	sucD	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Semialdehído succínico deshidrogenasa (dependiente de CoA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1228100	1
0009	7	4-HBd	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	4-hidroxibutirato deshidrogenasa (dependiente de NAD)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=YP_726053.1	2
0010	7	4-HBd	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	4-hidroxibutirato deshidrogenasa (dependiente de NAD)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1228100	1
0011	12/13	adhE	<i>E. coli</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.List.DetailAction.do?fromListFlag=true&featureType=1&orfId=1219	
0012	12/13	yqhD	<i>E. coli</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/	

					genes.List.DetailAction.do	
0013	13	bdhB	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Butanol deshidrogenasa II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349891.1	2
0020	11	ptb	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Fosfotrans-butirilasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=15896327	2
0021	10	buk1	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Butirato cinasa I	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137334	2
0022	10	buk2	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Butirato cinasa II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137415	2
0023	13	adhEm	aislado a partir de una metabiblioteca de consorcios microbianos anaerobios digestores de aguas residuales	Alcohol deshidrogenasa		(37)d}
0024	13	adhE	<i>Clostridium thermocellum</i>	Alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cth:Cthe_0423	
0025	13	ald	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Coenzima A-aldehído acilante deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=49036681	(31)d}
0026	13	bdhA	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Butanol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349892.1	2
0027	12	bld	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	Butiraldehído deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=31075383	4
0028	13	bdh	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	Butanol deshidrogenasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=124221917	4
0029	12/13	adhE	<i>Clostridium tetani</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ctc:CTC01366	
0030	12/13	adhE	<i>Clostridium perfringens</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpe:CPE2531	
0031	12/13	adhE	<i>Clostridium difficile</i>	Aldehído/alcohol deshidrogenasa	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cdf:CD2966	
0032	8	sucA	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG, Pasteur	α -cetoglutarato descarboxilasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=YP_977400.1	5
0033	9	cat2	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=6249316	
0034	9	cat2	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	4-hidroxibutirato coenzima A transferasa	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=34541558	
0035	6	sucD	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	Semialdehído succínico deshidrogenasa (dependiente de CoA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904963.1	
0036	7	4-HBd	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	4-hidroxibutirato deshidrogenasa dependiente de NAD	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904964.1	
0037	7	gbd	Bacteria sin cultivar	4-hidroxibutirato	www.ncbi.nlm.nih.gov/	6

				deshidrogenasa	entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=5916168	
0038	1	sucCD	<i>E. coli</i>	Succinil-CoA sintetasa	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.List.De tailAction.do	

¹Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993); Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996)

²Nolling *et al.*, J., J. Bacteriol. 183:4823-4838 (2001)

³Pohlmann *et al.*, Nat. Biotechnol. 24:1257-1262 (2006)

⁴Kosaka *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:58-68 (2007)

⁵Brosch *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:5596-5601 (2007)

⁶Henne *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 65:3901-3907 (1999)

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

lacZalfa-RI

5'GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC3'

lacZalfa 3'BB

5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'.

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

Todos los vectores tienen la designación pZ seguida por letras y números que indican el origen de replicación, el marcador de resistencia a antibióticos y la unidad promotora/reguladora. El origen de replicación es la segunda letra y se indica mediante E para orígenes basados en ColE1, A para p15A y S para pSC101. El primer número representa el marcador de resistencia a antibióticos (1 para ampicilina, 2 para kanamicina, 3 para cloranfenicol, 4 para espectinomicina y 5 para tetraciclina). El número final define el promotor que regulaba el gen de interés (1 para P_{LtetO-1}, 2 para P_{LlacO-1}, 3 para P_{A1lacO-1} y 4 para P_{lac/ara-1}). Siguen inmediatamente después el MCS y el gen de interés. Para el trabajo comentado en este caso se emplearon dos vectores de base, pZA33 y pZE13, modificados para las inserciones de bioladrillos tal como se comentó anteriormente. Una vez clonado(s) el/los gen(es) de interés en los mismos, se indican los plásmidos resultantes usando los códigos de genes de cuatro dígitos facilitados en la tabla 6; por ejemplo, pZA33-XXXX-YYYY-....

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

para reprimir la expresión de un gen unido a un promotor $P_{A1lacO-1}$. La cepa resultante se designó MG1655 $lacI^Q$. Se usó un procedimiento similar para introducir $lacI^Q$ en las cepas de delección.

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

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

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

Se determinó la actividad succinil-CoA transferasa (Cat1) monitorizando la formación de acetil-CoA a partir de succinil-CoA y acetato, siguiendo un procedimiento descrito previamente, Sohling y Gottschalk, J. Bacteriol. 178:871-880 (1996). Se determinó la actividad succinil-CoA sintetasa (SucCD) siguiendo la formación de succinil-CoA a partir de succinato y CoA en presencia de ATP. El experimento siguió un procedimiento descrito por Cha y Parks, J. Biol. Chem. 239:1961-1967 (1964). Se determinó la actividad succinato semialdehído deshidrogenasa (SucD) dependiente de CoA siguiendo la conversión de NAD en NADH a 340 nm en presencia de succinato semialdehído y CoA (Sohling y Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212:121-127 (1993)). Se determinó la actividad enzimática de 4-HB deshidrogenasa (4-HBd) monitorizando la oxidación de NADH para dar NAD a 340 nm en presencia de succinato semialdehído. El experimento siguió un procedimiento publicado, Gerhardt *et al.* Arch. Microbiol. 174:189-199 (2000). Se determinó la actividad 4-HB CoA transferasa (Cat2) usando un procedimiento modificado a partir de Scherf y Buckel, Appl. Environ. Microbiol. 57:2699-2702 (1991). Se determinó la formación de 4-HB-CoA o butiril-CoA a partir de acetil-CoA y 4-HB o butirato usando HPLC.

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

La actividad enzimática de PTB se mide en el sentido de butiril-CoA a butiril-fosfato tal como se describe en Cary *et al.* J. Bacteriol. 170:4613-4618 (1988). Proporciona fosfato inorgánico para la conversión, y sigue el aumento en CoA libre con el reactivo 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico), o DTNB. DTNB reacciona rápidamente con grupos tiol tales como CoA libre liberando el ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico (TNB) de color amarillo, que absorbe a 412 nm con un coeficiente de extinción molar de 14,140 M cm^{-1} . El tampón de ensayo contenía fosfato de potasio 150 mM a pH 7,4, DTNB 0,1 mM y butiril-CoA 0,2 mM, y se inició la reacción mediante la adición de 2 a 50 μ l de extracto celular. Se mide la actividad enzimática de BK en el sentido de formación de butirato a butiril-fosfato a expensas de ATP. El procedimiento es similar al ensayo para acetato cinasa descrito previamente, Rose *et al.*, J. Biol. Chem. 211:737-756 (1954). Sin embargo, se ha encontrado que otro protocolo de ensayo enzimático de acetato cinasa proporcionado por Sigma es más útil y sensible. Este ensayo vincula la conversión de ATP en ADP por acetato cinasa a la conversión vinculada de ADP y fosfoenol piruvato (PEP) en ATP y piruvato por piruvato cinasa, seguido por la

conversión de piruvato y NADH en lactato y NAD⁺ por lactato deshidrogenasa. La sustitución de butirato por acetato es la única modificación importante para permitir que el ensayo siga la actividad enzimática de BK. La mezcla de ensayo contenía tampón trietanolamina 80 mM a pH 7,6, butirato de sodio 200 mM, MgCl₂ 10 mM, NADH 0,1 mM, ATP 6,6 mM, fosfoenolpiruvato 1,8 mM. Se añadieron piruvato cinasa, lactato deshidrogenasa y miocinasa según las instrucciones del fabricante. Se inició la reacción añadiendo de 2 a 50 µl de extracto celular, y se monitorizó la reacción basándose en la disminución de la absorbancia a 340 nm que indica oxidación de NADH.

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

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

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

Los resultados demostraron la actividad de cada una de las cuatro etapas de ruta (tabla 7), aunque la actividad depende claramente de la fuente del gen, posición del gen en el vector y el contexto de otros genes con los que se expresa. Por ejemplo, el gen 0035 codifica para una semialdehído succínico deshidrogenasa que es más activa que la codificada por 0008, y 0036 y 0010n son genes más activos para 4-HB deshidrogenasa que 0009. También parece haber mejor actividad 4-HB deshidrogenasa cuando hay otro gen que precede al mismo en el mismo operón.

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

n.º de muestra	pZE13 (a)	pZA33 (b)	DO600	Prot. celular (c)	Cat1	SucD	4HBd	Cat2
1	cat1 (0004)		2,71	6,43	1,232	0,00		
2	cat1 (0004)-sucD (0035)		2,03	5,00	0,761	2,57		
3	cat1 (0004)-sucD (0008)		1,04	3,01	0,783	0,01		
4	sucD (0035)		2,31	6,94		2,32		
5	sucD (0008)		1,10	4,16		0,05		
6		4hbd (0009)	2,81	7,94	0,003		0,25	
7		4hbd (0036)	2,63	7,84			3,31	
8		4hbd (0010n)	2,00	5,08			2,57	
9	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	2,07	5,04	0,600	1,85	0,01	
10	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	2,08	5,40	0,694	1,73	0,41	
11	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	2,44	4,73	0,679	2,28	0,37	
12	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	1,08	3,99	0,572	-0,01	0,02	
13	cat1 (0004)-	4hbd (0036)	0,77	2,60	0,898	-0,01	0,04	

	sucD (0008)							
14	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0,63	2,47	0,776	0,00	0,00	
15		cat2 (0034)	2,56	7,86				1,283
16		cat2(0034)-4hbd(0036)	3,13	8,04			24,86	0,993
17		cat2(0034)-4hbd(0010n)	2,38	7,03			7,45	0,675
18		4hbd(0036)-cat2(0034)	2,69	8,26			2,15	7,490
19		4hbd(0010n)-cat2(0034)	2,44	6,59			0,59	4,101

Genes expresados a partir de Plac en pZE13, un plásmido de número de copias alto con origen de colE1 y resistencia a ampicilina. Los números de identificación de gen son tal como se facilitan en la tabla 6.

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

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

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

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

N.º de muestra	Cepa huésped	pZE13	pZA33	24 horas			48 horas		
				DO600	4HB, μ M	4HB norm.(a)	DO600	4HB, μ M	4HB norm. (a)
1	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4had(0009)	0,47	487	1036	1,04	1780	1711
2	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (027)	0,41	111	270	0,99	214	217
3	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd(0036)	0,47	863	1835	0,48	2152	4484
4	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd(0010n)	0,46	956	2078	0,49	2221	4533
5	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4had(0009)	0,38	493	1296	0,37	1338	3616
6	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd(0027)	0,32	26	81	0,27	87	323
7	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0,24	506	2108	0,31	1448	4672
8	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0,24	78	324	0,56	233	416
9	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0,53	656	1237	1,03	1643	1595
10	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0,44	92	209	0,98	214	218
11	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0,51	1072	2102	0,97	2358	2431
12	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0,51	981	1924	0,97	2121	2186
13	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd(0009)	0,35	407	1162	0,77	1178	1530
14	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd(0027)	0,51	19	36	1,07	50	47
15	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd(0036)	0,35	584	1669	0,78	1350	1731
16	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd(0010n)	0,32	74	232	0,82	232	283
17	MG1655 lacIq	sólo vector	sólo vector	0,8	1	2	1,44	3	2
18	MG1655 lacIq gabD	sólo vector	sólo vector	0,89	1	2	1,41	7	5

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

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

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

Una ruta alternativa para la producción de 4-HB a partir de glucosa es por medio de α -cetoglutarato. Se exploró el uso de una α -cetoglutarato descarboxilasa a partir de *Mycobacterium tuberculosis*, Tian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 10670-10675 (2005) para producir semialdehído succínico directamente a partir de α -cetoglutarato (etapa 8 en la figura 1). Para demostrar que este gen (0032) era funcional *in vivo*, se expresó en pZ13 en el mismo huésped que 4-HB deshidrogenasa (gen 0036) en pZA33. Esta cepa podía producir más de 4-HB 1,0 mM en un plazo de 24 horas tras la inducción con IPTG 1 mM (figura 4). Puesto que esta cepa no expresa una semialdehído succínico deshidrogenasa dependiente de CoA, se elimina la posibilidad de producción de semialdehído succínico por medio de succinil-CoA. También es posible que los genes nativos responsables de la producción de semialdehído succínico puedan funcionar en esta ruta (etapas 4 y 5 en la figura 1); sin embargo, la cantidad de 4-HB producido cuando el plásmido pZE13-0032 se dejó fuera del huésped es insignificante.

Producción de BDO a partir de 4-HB. La producción de BDO a partir de 4-HB requirió dos etapas de reducción, catalizadas por deshidrogenasas. Alcohol y aldehído deshidrogenasas (ADH y ALD, respectivamente) son enzimas dependientes de NAD^+/H y/o NADP^+/H que juntas pueden reducir un grupo ácido carboxílico en una molécula para dar un grupo alcohol, o a la inversa, puede realizar la oxidación de un alcohol para dar un ácido carboxílico. Esta biotransformación se ha demostrado en *Clostridium acetobutylicum* de tipo natural (Jewell *et al.*, Current Microbiology, 13:215-19 (1986)), pero no se identificaron ni las enzimas responsables ni los genes responsables. Además, se desconoce si se requiere en primer lugar la activación para dar 4-HB-CoA (etapa 9 en la figura 1), o si la aldehído deshidrogenasa (etapa 12) puede actuar directamente sobre 4-HB. Se desarrolló una lista de enzimas candidatas a partir de *C. acetobutylicum* y organismos relacionados basándose en la actividad conocida con los análogos no hidroxilados para dar 4-HB y productos intermedios de la ruta, o por similitud con los genes caracterizados (tabla 6). Puesto que algunos de los candidatos son deshidrogenasas multifuncionales, posiblemente podrían catalizar tanto la reducción dependiente de NAD(P)H del ácido (o derivado de CoA) para dar el aldehído, como del aldehído para dar el alcohol. Antes de empezar a trabajar con estos genes en *E. coli*, en primer lugar se validó el resultado al que se hizo referencia anteriormente usando *C. acetobutylicum* ATCC 824. Se hicieron crecer células en caldo Schaedler (Accumedia, Lansing, MI) complementado con 4-HB 10 mM, en una atmósfera anaerobia de CO_2 al 10%, H_2 al 10% y N_2 al 80% a 30°C. Se tomaron muestras de cultivo periódicas, se centrifugaron y se analizó el caldo para determinar BDO mediante CG-EM tal como se describe a continuación. Se detectaron concentraciones de BDO de 0,1 mM, 0,9 mM y 1,5 mM tras 1 día, 2 días y 7 días de incubación, respectivamente. No se detectó BDO en cultivo hecho crecer sin adición de 4-HB. Para demostrar que el BDO producido se derivaba a partir de glucosa, se hizo crecer la mejor cepa productora de BDO, MG1655 lacI^Q pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036, en medio mínimo M9 complementado con glucosa marcada uniformemente con ^{13}C 4 g/l. Se indujeron las células a DO de 0,67 con IPTG 1 mM, y se tomó una muestra tras 24 horas. Se realizó el análisis del sobrenadante de cultivo mediante espectrometría de masas.

A continuación se sometieron a prueba candidatos génicos para la ruta de conversión de 4-HB en BDO para determinar la actividad cuando se expresaban en el huésped de *E. coli* MG1655 lacI^Q . Se hicieron crecer cepas recombinantes que contenían cada candidato génico expresado en pZA33 en presencia de IPTG 0,25 mM durante cuatro horas a 37°C para inducir completamente la expresión de la enzima. Cuatro horas tras la inducción, se recogieron las células y se sometieron a ensayo para determinar la actividad de ADH y ALD tal como se describió

anteriormente. Puesto que 4-HB-CoA y 4-hidroxibutiraldehído no están disponibles comercialmente, se realizaron ensayos usando los sustratos no hidroxilados (tabla 9). La razón de la actividad entre sustratos de 4 carbonos y 2 carbonos para *C. acetobutylicum adhE2* (0002) y *E. coli adhE* (0011) eran similares a las indicadas previamente en la bibliografía Atsumi *et al.*, Biochim. Biophys. Acta. 1207:1-11 (1994).

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

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

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

Tabla 10. Concentraciones de BDO absolutas y normalizadas a partir de cultivos de células que expresan *adhE2* a partir de *C. acetobutylicum*, *sucD* a partir de *C. kluyveri*, o *sucD* a partir de *P. gingivalis* (datos de los experimentos 2, 9 y 10 en la figura 3), así como el control negativo (experimento 1).

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

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

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

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

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

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

Muestras	pZE13	pZA33	DO de inducción	24 horas				48 horas			
				DO 600 nm	Su	4HB	BDO	DO 600 nm	Su	4HB	BDO
1	cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,92	1,29	5,44	1,37	0,240	1,24	6,42	1,49	0,280
2	cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,36	1,11	6,90	1,24	0,011	1,06	7,63	1,33	0,011
3	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,20	0,44	0,34	1,84	0,050	0,60	1,93	2,67	0,119
4	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1,31	1,90	9,02	0,73	0,073	1,95	9,73	0,82	0,077
5	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0,17	0,45	1,04	1,04	0,008	0,94	7,13	1,02	0,017
6	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1,30	1,77	10,47	0,25	0,004	1,80	11,49	0,28	0,003
7	cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1,09	1,29	5,63	2,15	0,461	1,38	6,66	2,30	0,520
8	cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1,81	2,01	11,28	0,02	0,000	2,24	11,13	0,02	0,000
9	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0,24	1,99	2,02	2,32	0,106	0,89	4,85	2,41	0,186
10	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0,98	1,17	5,30	2,08	0,569	1,33	6,15	2,14	0,640
11	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0,20	0,53	1,38	2,30	0,019	0,91	8,10	1,49	0,034
12	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	2,14	2,73	12,07	0,16	0,000	3,10	11,79	0,17	0,002

13	sólo vector	sólo vector	2,11	2,62	9,03	0,01	0,000	3,00	12,05	0,01	0,000
----	-------------	-------------	------	------	------	------	-------	------	-------	------	-------

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

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

Se realizó CG-EM en un cromatógrafo de gases 6890N de Agilent, conectado con un detector selectivo de masas (MSD) 5973N que se hizo funcionar en el modo de ionización de impacto electrónico (EI), que se usó para el análisis. Se usó una columna capilar DB-5MS (J&W Scientific, Agilent Technologies), 30 m x 0,25 mm de d.i. x 0,25 μ m de grosor de película. Se hizo funcionar el CG en un modo de inyección fraccionada introduciendo 1 μ l de muestra a una ración de fraccionamiento de 20:1. La temperatura del orificio de inyección era de 250°C. Se usó helio como gas portador, y se mantuvo la velocidad de flujo a 1,0 ml/min. Se optimizó un programa de gradiente de temperatura para garantizar buena resolución de los analitos de interés e interferencia de matriz mínima. Inicialmente se mantuvo el horno a 80°C durante 1 min, luego se aumentó hasta 120°C a 2°C/min, seguido por un aumento rápido hasta 320°C a 100°C/min y un mantenimiento final durante 6 min a 320°C. Se mantuvo el tubo de transferencia de conexión con EM a 280°C. Se adquirieron los datos usando ajustes de configuración de EM de "masa baja" y barrido en un intervalo de masa de 30-400 m/z. El tiempo de análisis total fue de 29 min incluyendo 3 min de retraso del disolvente. Los tiempos de retención correspondían a 5,2, 10,5, 14,0 y 18,2 min para ciclohexanol derivatizado con BSTFA, BDO, 4-HB y succinato, respectivamente. Para análisis cuantitativo, se seleccionaron los siguientes fragmentos de masa específica (cromatogramas de iones extraídos): m/z 157 para ciclohexanol de patrón interno, 116 para BDO y 147 para tanto 4-HB como succinato. Se construyeron curvas de calibración patrones usando disoluciones de analito en el medio de cultivo celular o fermentación correspondiente para coincidir lo más posible con la matriz de muestra. Se procesaron los datos de CG-EM usando software Environmental Data Analysis ChemStation (Agilent Technologies).

Los resultados indicaron que la mayoría del 4-HB y BDO producidos estaban marcados con ^{13}C (figura 6, lados de la derecha). Para comparación se muestran espectros de masas a partir de un cultivo paralelo que se hizo crecer en glucosa no marcada (figura 6; lados de la izquierda). Obsérvese que los picos observados son para fragmentos de la molécula derivatizada que contenía diferentes números de átomos de carbono a partir del metabolito. El reactivo de derivatización también aporta algunos átomos de carbono y silicio que marcan la distribución que se produce de manera natural, por lo que los resultados no son estrictamente cuantitativos.

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

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

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

EJEMPLO III

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

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

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

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

Protocolo de fermentación para producir 4-HB/GBL (completamente continuo): En primer lugar se hace crecer el organismo de producción en modo discontinuo usando el aparato y la composición de medio descritos anteriormente, excepto porque la concentración de glucosa inicial es de 30-50 g/l. Cuando se agota la glucosa, se suministra medio de alimentación de la misma composición de manera continua a una velocidad de entre 0,5 l/h y 1 l/h y se retira líquido a la misma velocidad. La concentración de 4-HB en el biorreactor permanece constante a 30-40 g/l, y la densidad celular permanece constante a entre 3-5 g/l. Se mantiene la temperatura a 30°C, y se mantiene el pH a 4,5 usando NaOH y HCl concentrados, según se requiera. Se hace funcionar el biorreactor de manera continua durante un mes, tomándose muestras cada día para garantizar la constancia de la concentración de 4-HB. En modo continuo, se retira constantemente el contenido del fermentador a medida que se suministra medio de alimentación nuevo. Entonces se somete la corriente de salida, que contiene células, medio y productos 4-HB y/o GBL, a un procedimiento de separación de producto continuo, con o sin eliminación de células y residuos celulares, y tendrá lugar mediante métodos de separación continua convencionales empleados en la técnica para separar productos orgánicos de disoluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido continua usando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una disolución orgánica de 4-HB/GBL. Posteriormente se somete la disolución resultante a métodos de destilación continua convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar GBL (punto de ebullición de 204-205°C) que se aísla como un líquido purificado.

Protocolo de reducción de GBL: Una vez aislado y purificado GBL tal como se describió anteriormente, entonces se someterá a protocolos de reducción tales como aquéllos bien conocidos en la técnica (referencias citadas) para producir 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos. Se conocen bien catalizadores de hidrogenación heterogéneos u homogéneos combinados con GBL a presión de hidrógeno para proporcionar los productos 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano (THF) o una mezcla de los mismos. Es importante observar que la mezcla del producto 4-HB/GBL que se separa del caldo de fermentación, tal como se describió anteriormente, puede someterse directamente, antes del aislamiento y la purificación de GBL, a estos mismos protocolos de reducción para proporcionar los productos 1,4-butanodiol o tetrahidrofurano o una mezcla de los mismos. Entonces se aíslan y se purifican los productos resultantes, 1,4-butanodiol y THF, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Protocolo de fermentación e hidrogenación para producir BDO o THF directamente (discontinuo): Se hacen crecer células en un biorreactor de 10 l burbujeador con una mezcla de N_2/CO_2 , usando 5 l de caldo que contiene fosfato de potasio 5 g/l, cloruro de amonio 2,5 g/l, sulfato de magnesio 0,5 g/l y licor de maceración de maíz 30 g/l, y una concentración de glucosa inicial de 20 g/l. A medida que las células crecen y usan la glucosa, se alimenta glucosa al

70% adicional en el biorreactor a una velocidad que equilibra aproximadamente el consumo de glucosa. Se mantiene la temperatura del biorreactor a 30°C. El crecimiento continua durante aproximadamente 24 horas, hasta que 4-HB alcanza una concentración de entre 20-200 g/l, siendo la densidad celular de entre 5 y 10 g/l. No se controla el pH, y normalmente disminuirá hasta pH 3-6 hacia el final de la ejecución. Tras completarse el periodo de cultivo, se pasa el contenido del fermentador a través de una unidad de separación celular (por ejemplo, centrífuga) para eliminar células y residuos celulares, y se transfiere el caldo de fermentación a una unidad de reducción (por ejemplo, recipiente de hidrogenación), en la que se reduce directamente la mezcla de 4-HB/GBL para dar o bien 1,4-butanodiol o bien THF o bien una mezcla de los mismos. Tras completarse el procedimiento de reducción, se transfiere el contenido del reactor a una unidad de separación de producto. El aislamiento de 1,4-butanodiol y/o THF tendrá lugar mediante procedimientos de separación convencionales empleados en la técnica para separar productos orgánicos de disoluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido usando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una disolución orgánica de 1,4-butanodiol y/o THF. Entonces se somete la disolución resultante a métodos de destilación convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y para proporcionar 1,4-butanodiol y/o THF que se aíslan como líquidos purificados.

Protocolo de fermentación e hidrogenación para producir BDO o THF directamente (completamente continuo): En primer lugar se hacen crecer las células en modo discontinuo usando el aparato y la composición de medio descritos anteriormente, excepto porque la concentración de glucosa inicial es de 30-50 g/l. Cuando se agota la glucosa, se suministra medio de alimentación de la misma composición de manera continua a una velocidad de entre 0,5 l/h y 1 l/h, y se retira líquido a la misma velocidad. La concentración de 4-HB en el biorreactor permanece constante a 30-40 g/l, y la densidad celular permanece constante a entre 3-5 g/l. Se mantiene la temperatura a 30°C, y se mantiene el pH a 4,5 usando NaOH y HCl concentrados, según se requiera. Se hace funcionar el biorreactor de manera continua durante un mes, tomándose muestras cada día para garantizar la constancia de la concentración de 4-HB. En modo continuo, se retira constantemente el contenido del fermentador a medida que se suministra medio de alimentación nuevo. Entonces se hace pasar la corriente de salida, que contiene células, medio y productos 4-HB y/o GBL, a través de una unidad separación celular (por ejemplo, centrífuga) para eliminar células y residuos celulares, y se transfiere el caldo de fermentación a una unidad de reducción continua (por ejemplo, recipiente de hidrogenación), en el que se reduce directamente la mezcla 4-HB/GBL para dar o bien 1,4-butanodiol o bien THF o bien una mezcla de los mismos. Tras completarse el procedimiento de reducción, se transfiere el contenido del reactor a una unidad de separación de producto continua. El aislamiento de 1,4-butanodiol y/o THF tendrá lugar mediante procedimientos de separación continua convencionales empleados en la técnica para separar productos orgánicos de disoluciones acuosas diluidas, tales como extracción líquido-líquido usando un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno) para proporcionar una disolución orgánica de 1,4-butanodiol y/o THF. Entonces se somete la disolución resultante a métodos de destilación continua convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y proporcionar 1,4-butanodiol y/o THF que se aíslan como líquidos purificados.

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

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

Posteriormente se somete la disolución resultante a métodos de destilación continua convencionales para retirar y recircular el disolvente orgánico y proporcionar BDO (punto de ebullición de 228-229°C) que se aísla como un líquido purificado (p.f. 20°C).

5 EJEMPLO IV

Rutas de BDO a modo de ejemplo

10 Este ejemplo describe enzimas a modo de ejemplo y genes correspondientes para rutas sintéticas de 1,4-butanodiol (BDO).

15 En las figuras 8-13 se muestran rutas sintéticas de BDO a modo de ejemplo. Las rutas representadas en las figuras 8-13 parten de productos intermedios metabólicos centrales comunes para dar 1,4-butanodiol. Todas las transformaciones representadas en las figuras 8-13 se encuentran dentro de las 18 categorías generales de transformaciones mostradas en la tabla 14. A continuación se describen varios genes candidatos bioquímicamente caracterizados en cada categoría. Se indican específicamente genes que pueden aplicarse para catalizar las transformaciones apropiadas en las figuras 9-13 cuando se clonan y se expresan en un organismo huésped. Los tres genes a modo de ejemplo superiores para cada una de las etapas clave en las figuras 9-13 se proporcionan en las tablas 15-23 (véase a continuación). Se proporcionan genes a modo de ejemplo para las rutas representadas en la figura 8 y se describen en el presente documento.

25 Tabla 14. Tipos de enzimas requeridos para convertir productos intermedios metabólicos centrales comunes en 1,4-butanodiol. Los tres primeros dígitos de cada etiqueta corresponden a los tres primeros dígitos del número de la comisión enzimática que indican el tipo general de transformación independientemente de la especificidad de sustrato.

Etiqueta	Función
1.1.1.a	Oxidoreductasa (de cetona a hidroxilo o de aldehído a alcohol)
1.1.1.c	Oxidoreductasa (2 etapas, de acil-CoA a alcohol)
1.2.1.b	Oxidoreductasa (de acil-CoA a aldehído)
1.2.1.c	Oxidoreductasa (de 2-oxo-ácido a acil-CoA, descarboxilación)
1.2.1.d	Oxidoreductasa (fosforilación/desfosforilación)
1.3.1.a	Oxidoreductasa que funciona sobre donadores de CH-CH
1.4.1.a	Oxidoreductasa que funciona sobre aminoácidos
2.3.1.a	Aciltransferasa (transferencia de grupo fosfato)
2.6.1.a	Aminotransferasa
2.7.2.a	Fosfotransferasa, aceptor de grupo carboxilo
2.8.3.a	Coenzima-A transferasa
3.1.2.a	Tioléster hidrolasa (específica de CoA)
4.1.1.a	Carboxi-liasa
4.2.1.a	Hidro-liasa
4.3.1.a	Amoniaco-liasa
5.3.3.a	Isomerasa
5.4.3.a	Aminomutasa
6.2.1.a	Ácido-tiol ligasa

1.1.1.a - Oxidoreductasa (de aldehído a alcohol o de cetona a hidroxilo)

30 De aldehído a alcohol. 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 por moléculas de más de C(3) (Sulzenbacher *et al.* Journal of Molecular Biology 342:489-502 (2004)), y bdh I y bdh II de *C. acetobutylicum* que convierten butiraldehído en butanol (Walter *et al.* Journal of Bacteriology 174:7149-7158 (1992)). Las secuencias de proteína para cada uno de estos productos génicos a modo de ejemplo, si están disponibles, pueden encontrarse usando los siguientes números de registro de GenBank:

alrA	BAB12273.1	<i>Acinetobacter</i> sp. cepa M-1
ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>
bdh I	NP_349892.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
bdh II	NP_349891.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

40 Las enzimas que muestran actividad 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.61) también se encuentran dentro de 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)).

4hbd	YP_726053.1	<i>Ralstonia eutropha</i> H16
4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555
4hbd	Q94B07	<i>Arabidopsis thaliana</i>

- 5 Otra enzima a modo de ejemplo es 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa que cataliza la oxidación reversible de 3-hidroxiisobutirato para dar semialdehído de metilmalonato. 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 352:905-17 (2005)). La reversibilidad de la 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa humana se ha demostrado usando sustrato marcado de manera isotópica (Manning *et al.* Biochem J 231:481-484 (1985)). Los genes adicionales que codifican para esta enzima incluyen 3hidh en *Homo sapiens* (Hawes *et al.* Methods Enzymol. 324:218-228 (2000)) y *Oryctolagus cuniculus* (Chowdhury *et al.* Biosci. Biotechnol Biochem. 60:2043-2047 (1996); Hawes *et al.* Methods Enzymol. 324:218-228 (2000)), mmsb en *Pseudomonas aeruginosa*, y dhat en *Pseudomonas putida* (Aberhart *et al.* J Chem. Soc. [Perkin 1] 6:1404-1406 (1979); Chowdhury *et al.* Biosci. Biotechnol Biochem. 67:438-441 (2003); Chowdhury *et al.* Biosci. Biotechnol Biochem. 60:2043-2047 (1996)).

P84067	P84067	<i>Thermus thermophilus</i>
mmsb	P28811.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
dhat	Q59477.1	<i>Pseudomonas putida</i>
3hidh	P31937.2	<i>Homo sapiens</i>
3hidh	P32185.1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>

- 20 También se ha mostrado que varias enzimas 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa convierten semialdehído malónico en ácido 3-hidroxiisobutírico (3-HP). Tres candidatos génicos que muestran esta actividad son mmsB de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1(62), mmsB de *Pseudomonas putida* KT2440 (Liao *et al.*, publicación estadounidense 2005/0221466) y mmsB de *Pseudomonas putida* E23 (Chowdhury *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047 (1996)). También se ha identificado una enzima con actividad 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa en *Alcaligenes faecalis* M3A (Gokam *et al.*, patente estadounidense n.º 7.393.676; Liao *et al.*, publicación estadounidense n.º 2005/0221466). Pueden deducirse candidatos génicos adicionales de otros organismos incluyendo *Rhodobacter spaeroides* mediante similitud de secuencia.

mmsB	AAA25892.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
mmsB	NP_252259.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
mmsB	NP_746775.1	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
mmsB	JC7926	<i>Pseudomonas putida</i> E23
orfB1	AAL26884	<i>Rhodobacter spaeroides</i>

- 30 La conversión de semialdehído malónico en 3-HP también puede lograrse mediante otras dos enzimas: 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa dependiente de NADH y malonato semialdehído reductasa dependiente de NADPH. Se piensa que una 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa dependiente de NADH participa en rutas de biosíntesis de beta-alanina a partir de propionato en bacterias y plantas (Rathinasabapathi, B. Journal of Plant Pathology 159:671-674 (2002); Stadtman, E. R. J. Am. Chem. Soc. 77:5765-5766 (1955)). Esta enzima no se ha asociado con un gen en ningún organismo hasta la fecha. La malonato semialdehído reductasa dependiente de NADPH cataliza la reacción inversa en bacterias autótrofas de fijación de CO₂. Aunque se ha detectado la actividad enzimática en *Metallosphaera sedula*, se desconoce la identidad del gen (Alber *et al.* J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)).

- 40 De cetona a hidroxilo. Existen varias alcohol deshidrogenasas a modo de ejemplo que convierten una cetona en un grupo funcional hidroxilo. Dos de tales enzimas de *E. coli* se codifican 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, A. y H. G. Schlegel Eur. J. Biochem. 130:329-334 (1983)). La conversión de alfa-cetoadipato en alfa-hidroxiadipato puede catalizarse mediante 2-cetoadipato 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)). Un candidato adicional para esta etapa es la 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa mitocondrial (bdh) 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. Otra alcohol deshidrogenasa a modo de ejemplo convierte acetona en isopropanol tal como se mostró 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 y Burstein Biochemistry 28:6549-6555 (1989)).

mdh	AAC76268.1	<i>Escherichia coli</i>
ldhA	NP_415898.1	<i>Escherichia coli</i>

ldh	YP_725182.1	<i>Ralstonia eutropha</i>
bdh	AAA58352.1	<i>Homo sapiens</i>
adh	AAA23199.2	<i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B593
adh	P14941.1	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> HTD4

Las 3-hidroxiacilo deshidrogenasas a modo de ejemplo que convierten acetoacetyl-CoA en 3-hidroxiacetyl-CoA incluyen hbd de *C. acetobutylicum* (Boynton *et al.* Journal of Bacteriology 178:3015-3024 (1996)), hbd de *C. beijerinckii* (Colby *et al.* Appl Environ. Microbiol 58:3297-3302 (1992)), y varias enzimas similar de *Metallosphaera sedula* (Berg *et al.* Archaea. Science. 318:1782-1786 (2007)).

hbd	NP_349314.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
hbd	AAM14586.1	<i>Clostridium beijerinckii</i>
Msed_1423	YP_001191505	<i>Metallosphaera sedula</i>
Msed_0399	YP_001190500	<i>Metallosphaera sedula</i>
Msed_0389	YP_001190490	<i>Metallosphaera sedula</i>
Msed_1993	YP_001192057	<i>Metallosphaera sedula</i>

1.1.1.c - Oxidorreductasa (2 etapas, de acil-CoA a alcohol)

Las oxidorreductasas de 2 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, se ha mostrado que la enzima codificada por adhE en *Leuconostoc mesenteroides* 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)).

adhE	NP_415757.1	<i>Escherichia coli</i>
adhE2	AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
adhE	AAV66076.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Otra enzima a modo de ejemplo puede convertir malonil-CoA en 3-HP. Se ha caracterizado una enzima dependiente de NADPH con esta actividad en *Chloroflexus aurantiacus* en el que participa en el ciclo de 3-hidroxiisovalerato (Hugler *et al.*, J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002); Strauss y Fuchs, 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.*, J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002)). No se ha mostrado que ninguna otra enzima en otros organismos catalice esta reacción específica; sin embargo hay evidencias bioinformáticas de que otros organismos pueden tener rutas similares (Klatt *et al.*, Environ. Microbiol. 9:2067-2078 (2007)). Pueden deducirse candidatos enzimáticos en otros organismos incluyendo *Roseiflexus castenholzii*, *Erythrobacter sp. NAP1* y gamma-proteobacteria marina HTCC2080 mediante similitud de secuencia.

mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
Rcas_2929	YP_001433009.1	<i>Roseiflexus castenholzii</i>
NAP1_02720	ZP_01039179.1	<i>Erythrobacter sp. NAP1</i>
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	gamma-proteobacteria marina HTCC2080

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

FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>
-----	------------	-----------------------------

1.2.1.b - Oxidorreductasa (de acil-CoA a aldehído)

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 y Somerville, J. 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 y Gottschalk J Bacteriol 178:871-80 (1996); Sohling y Gottschalk 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 acilante en *Pseudomonas sp.*, codificada por bphG, es aún otra ya que se ha mostrado que oxida y acila acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído (Powlowski *et al.* J Bacteriol. 175:377-385 (1993)).

acr1	YP_047869.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
------	-------------	------------------------------------

acr1	AAC45217	<i>Acinetobacter bailyi</i>
acr1	BAB85476.1	<i>Acinetobacter</i> sp. cepa M-1
sucD	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
sucD	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
bphG	BAA03892.1	<i>Pseudomonas</i> sp

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 de carbono autótrofa a través del ciclo de 3-hidroxi- β -ketopiruvato en bacterias arqueas termoacidófilas (Berg *et al.* Science 318:1782-1786 (2007); Thauer, R. K. Science 318:1732-1733 (2007)). La enzima usa NADPH como cofactor y se ha caracterizado en *Metallosphaera* y *Sulfolobus* spp (Alber *et al.* J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); Hugler *et al.* J. Bacteriol. 184:2404-2410 (2002)). La enzima se codifica por *Msed_0709* en *Metallosphaera sedula* (Alber *et al.* J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); Berg *et al.* Science 318:1782-1786 (2007)). Se clonó un gen que codificaba para una malonil-CoA reductasa de *Sulfolobus tokodaii* y se expresó de manera heteróloga en *E. coli* (Alber *et al.* J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)). Aunque la funcionalidad aldehído deshidrogenasa de estas enzimas es similar a la de la deshidrogenasa bifuncional de *Chloroflexus aurantiacus*, hay poca similitud de secuencia. Ambos candidatos de enzima malonil-CoA reductasa tienen una alta similitud de secuencia con aspartato-semialdehído deshidrogenasa, una enzima que cataliza la reducción y desfosforilación simultánea de aspartil-4-fosfato para dar semialdehído de aspartato. Pueden encontrarse candidatos génicos adicionales mediante homología de secuencia con proteínas en otros organismos incluyendo *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius*.

<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>
<i>mcr</i>	NP_378167.1	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>

1.2.1.c - Oxidorreductasa (de 2-oxo-ácido a acil-CoA, descarboxilación)

Las enzimas en esta familia incluyen 1) 2-ceto-ácido de cadena ramificada deshidrogenasa, 2) alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, y 3) el complejo multienzimático de piruvato deshidrogenasa (PDHC). Estas enzimas son complejos multienzimáticos que catalizan una serie de reacciones parciales que dan como resultado la descarboxilación acilante oxidativa de 2-ceto-ácidos. Cada uno de los complejos de 2-ceto-ácido deshidrogenasa ocupa posiciones clave en el metabolismo intermedio, y normalmente la actividad enzimática está estrechamente regulada (Fries *et al.* Biochemistry 42:6996-7002 (2003)). Las enzimas comparten una estructura compleja pero común compuesta por múltiples copias de tres componentes catalíticos: alfa-cetoácido descarboxilasa (E1), dihidrolipoamida aciltransferasa (E2) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3). El componente E3 se comparte entre todos los complejos de 2-cetoácido deshidrogenasa en un organismo, mientras que los componentes E1 y E2 se codifican por genes diferentes. Los componentes enzimáticos están presentes en numerosas copias en el complejo y usan múltiples cofactores para catalizar una secuencia de reacciones dirigida a través de canalización de sustrato. El tamaño global de estos complejos de deshidrogenasa es muy grande, con masas moleculares de entre 4 y 10 millones de Da (es decir, mayores que un ribosoma).

La actividad de enzimas en la familia de 2-ceto-ácido deshidrogenasa es normalmente baja o limitada en condiciones anaerobias en *E. coli*. La producción aumentada de NADH (o NADPH) puede conducir a un desequilibrio redox, y el propio NADH sirve como inhibidor para la función enzimática. Los esfuerzos de diseño por ingeniería genética han aumentado la actividad anaerobia del complejo de piruvato deshidrogenasa de *E. coli* (Kim *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Kim *et al.* J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Zhou *et al.* Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). Por ejemplo, el efecto inhibidor de NADH puede superarse diseñando por ingeniería genética una mutación H322Y en el componente E3 (Kim *et al.* J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)). Estudios estructurales de componentes individuales y cómo funcionan en conjunto de manera compleja proporcionan información sobre los mecanismos catalíticos y la arquitectura de enzimas en esta familia (Aevärsön *et al.* Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999); Zhou *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807 (2001)). La especificidad de sustrato de los complejos de deshidrogenasa varía en diferentes organismos, pero generalmente las ceto-ácido de cadena ramificada deshidrogenasas tienen la gama de sustrato más amplia.

La alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (AKGD) convierte alfa-cetoglutarato en succinil-CoA y es el principal sitio de control del flujo metabólico a través del ciclo de TCA (Hansford, R. G. Curr. Top. Bioenerg. 10:217-278 (1980)). Codificada por los genes *sucA*, *sucB* y *lpd* en *E. coli*, la expresión génica de AKGD se regula por disminución en condiciones anaerobias y durante el crecimiento con glucosa (Park *et al.* Mol. Microbiol. 15:473-482 (1995)). Aunque la gama de sustrato de AKGD es estrecha, estudios estructurales del núcleo catalítico del componente E2 localizan con precisión residuos específicos responsables de la especificidad de sustrato (Knapp *et al.* J. Mol. Biol. 280:655-668 (1998)). La AKGD de *Bacillus subtilis*, codificada por *odhAB* (E1 y E2) y *pdhD* (E3, dominio compartido), se regula a nivel transcripcional y depende de la fuente de carbono y la fase de crecimiento del organismo (Resnekov *et al.* Mol. Gen. Genet. 234:285-296 (1992)). En levadura, el gen *LPD1* que codifica para el componente E3 se regula a nivel transcripcional mediante glucosa (Roy y Dawes J. Gen. Microbiol. 133:925-933 (1987)). El componente E1,

codificado por KGD1, también se regula mediante glucosa y se activa mediante los productos de HAP2 y HAP3 (Repetto y Tzagoloff Mol. Cell Biol. 9:2695-2705 (1989)). El complejo enzimático de AKGD, inhibido por los productos NADH y succinil-CoA, es muy adecuado en sistemas de mamífero, ya que la función alterada de se ha asociado con varias enfermedades neurológicas (Tretter y dam-Vizi Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 360:2335-2345 (2005)).

sucA	NP_415254.1	<i>Escherichia coli</i> cepa K12 sustr. MG1655
sucB	NP_415255.1	<i>Escherichia coli</i> cepa K12 sustr. MG1655
lpd	NP_414658.1	<i>Escherichia coli</i> cepa K12 sustr. MG1655
odhA	P23129.2	<i>Bacillus subtilis</i>
odhB	P16263.1	<i>Bacillus subtilis</i>
pdhD	P21880.1	<i>Bacillus subtilis</i>
KGD1	NP_012141.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
KGD2	NP_010432.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
LPD1	NP_116635.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

El complejo de 2-ceto-ácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCKAD), también conocido como 2-oxoisovalerato deshidrogenasa, participa en rutas de degradación de aminoácidos de cadena ramificada, convirtiendo derivados de 2-cetoácidos de valina, leucina e isoleucina en sus derivados de acil-CoA y CO₂. El complejo se ha estudiado en muchos organismos incluyendo *Bacillus subtilis* (Wang *et al.* Eur. J. Biochem. 213:1091-1099 (1993)), *Rattus norvegicus* (Namba *et al.* J. Biol. Chem. 244:4437-4447 (1969)) y *Pseudomonas putida* (Sokatch J. Bacteriol. 148:647-652 (1981)). En *Bacillus subtilis* la enzima se codifica por genes pdhD (componente E3), bfmBB (componente E2), bfmBAA y bfmBAB (componente E1) (Wang *et al.* Eur. J. Biochem. 213:1091-1099 (1993)). En mamíferos, el complejo se regula mediante fosforilación por fosfatasas y proteína cinasas específicas. El complejo se ha estudiado en hepatocitos de rata (Chicco *et al.* J. Biol. Chem. 269:19427-19434 (1994)) y se codifica por genes Bckdha (E1 alfa), Bckdha (E1 beta), Dbt (E2), y Dld (E3). Se han cristalizado los componentes E1 y E3 del complejo BCKAD de *Pseudomonas putida* (Aevarsson *et al.* Nat. Struct. Biol. 6:785-792 (1999); Mattevi Science 255:1544-1550 (1992)) y se ha estudiado el complejo enzimático (Sokatch *et al.* J. Bacteriol. 148:647-652 (1981)). La transcripción de los genes de BCKAD de *P. putida* se activa mediante el producto génico de bkdR (Hester *et al.* Eur. J. Biochem. 233:828-836 (1995)). 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 mostrado que este complejo tiene una amplia gama de sustrato que incluye oxo-ácidos lineales tales como 2-oxobutanoato y alfa-cetoglutarato, además de los precursores de aminoácido de cadena ramificada. El sitio activo de la BCKAD bovina se diseñó por ingeniería genética para favorecer el sustrato alternativo acetil-CoA (Meng y Chuang, Biochemistry 33:12879-12885 (1994)).

bfmBB	NP_390283.1	<i>Bacillus subtilis</i>
bfmBAA	NP_390285.1	<i>Bacillus subtilis</i>
bfmBAB	NP_390284.1	<i>Bacillus subtilis</i>
pdhD	P21880.1	<i>Bacillus subtilis</i>
lpdV	P09063.1	<i>Pseudomonas putida</i>
bkdB	P09062.1	<i>Pseudomonas putida</i>
bkdA1	NP_746515.1	<i>Pseudomonas putida</i>
bkdA2	NP_746516.1	<i>Pseudomonas putida</i>
Bckdha	NP_036914.1	<i>Rattus norvegicus</i>
Bckdha	NP_062140.1	<i>Rattus norvegicus</i>
Dbt	NP_445764.1	<i>Rattus norvegicus</i>
Dld	NP_955417.1	<i>Rattus norvegicus</i>

También se ha estudiado extensamente el complejo de piruvato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de piruvato en acetil-CoA. En la enzima de *E. coli*, residuos específicos en el componente E1 son responsables de la especificidad de sustrato (Bisswanger, H. J Biol Chem. 256:815-822 (1981); Bremer, J. Eur. J Biochem. 8:535-540 (1969); Gong *et al.* J Biol Chem. 275:13645-13653 (2000)). Tal como se mencionó anteriormente, esfuerzos de diseño por ingeniería genética de enzimas han mejorado la actividad enzimática de PDH de *E. coli* en condiciones anaerobias (Kim *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Kim J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Zhou *et al.* Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). A diferencia de la PDH de *E. coli*, el complejo de *B. subtilis* es activo y se requiere para el crecimiento en condiciones anaerobias (Nakano J. Bacteriol. 179:6749-6755 (1997)). La PDH de *Klebsiella pneumoniae*, caracterizada durante el crecimiento con glicerol, también es activa en condiciones anaerobias (Menzel *et al.* J. Biotechnol. 56:135-142 (1997)). Están disponibles estructuras cristalinas del complejo enzimático de riñón bovino (Zhou *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807 (2001)) y el dominio catalítico de E2 de *Azotobacter vinelandii* (Mattevi *et al.* Science 255:1544-1550 (1992)). Algunos complejos enzimáticos de PDH de mamífero pueden reaccionar con sustratos alternativos tales como 2-oxobutanoato, aunque la cinética comparativa de PDH y BCKAD de *Rattus norvegicus* indica que BCKAD tiene una mayor actividad sobre 2-oxobutanoato como sustrato (Paxton *et al.* Biochem. J. 234:295-303 (1986)).

aceE	NP_414656.1	<i>Escherichia coli</i> cepa K12 sustr. MG1655
------	-------------	--

aceF	NP_414657.1	<i>Escherichia coli</i> cepa K12 sustr. MG1655
lpd	NP_414658.1	<i>Escherichia coli</i> cepa K12 sustr. MG1655
pdhA	P21881.1	<i>Bacillus subtilis</i>
pdhB	P21882.1	<i>Bacillus subtilis</i>
pdhC	P21883.2	<i>Bacillus subtilis</i>
pdhD	P21880.1	<i>Bacillus subtilis</i>
aceE	YP_001333808.1	<i>Klebsiella pneumonia</i> MGH78578
aceF	YP_001333809.1	<i>Klebsiella pneumonia</i> MGH78578
lpdA	YP_001333810.1	<i>Klebsiella pneumonia</i> MGH78578
Pdha1	NP_001004072.2	<i>Rattus norvegicus</i>
Pdha2	NP_446446.1	<i>Rattus norvegicus</i>
Dlat	NP_112287.1	<i>Rattus norvegicus</i>
Dld	NP_955417.1	<i>Rattus norvegicus</i>

Como alternativa a los grandes complejos multienzimáticos de 2-ceto-ácido deshidrogenasa descritos anteriormente, algunos organismos anaerobios usan enzimas en la familia de 2-cetoácido oxidoreductasa (OFOR) para catalizar la descarboxilación acilante oxidativa de 2-ceto-ácidos. A diferencia de los complejos de deshidrogenasa, estas enzimas contienen agrupaciones de hierro-azufre, usan diferentes cofactores y usan ferredoxina o flavodoxina como aceptores de electrones en lugar de NAD(P)H. Aunque la mayoría de las enzimas en esta familia son específicas para piruvato como sustrato (POR), se ha mostrado que algunas 2-ceto-ácido:ferredoxina oxidoreductasas aceptan una amplia gama de 2-cetoácidos como sustratos incluyendo alfa-cetoglutarato y 2-oxobutanoato (Fukuda y Wakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); Zhang *et al.* J. Biochem. 120:587-599 (1996)). Una enzima de este tipo es la OFOR de la arquea termoacidófila *Sulfolobus tokodaii* 7, que contiene una subunidad alfa y una beta codificada por el gen ST2300 (Fukuda y Wakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002); Zhang *et al.* J. Biochem. 120:587-599 (1996)). Se ha desarrollado un sistema de expresión basado en plásmidos para expresar eficazmente esta proteína en *E. coli* (Fukuda *et al.* Eur. J. Biochem. 268:5639-5646 (2001)) y se determinaron los residuos implicados en la especificidad de sustrato (Fukuda y Wakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2002)). También se han clonado recientemente dos OFOR de *Aeropyrum pernix* cepa K1 en *E. coli*, se han caracterizado y se ha encontrado que reaccionan con una amplia gama de 2-oxoácidos (Nishizawa *et al.* FEBS Lett. 579:2319-2322 (2005)). Las secuencias génicas de estos candidatos de OFOR están disponibles, aunque hasta ahora no se les han asignado identificadores de GenBank. Existen evidencias bioinformáticas de que están presentes enzimas similares en todas las arqueas, algunas bacterias anaerobias y eucariotas mitocondriales (Fukuda y Wakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80 (2005)). Esta clase de enzima también es interesante desde un punto de vista energético, ya que puede usarse ferredoxina reducida para generar NADH mediante ferredoxina-NAD reductasa (Petitdemange *et al.* Biochim. Biophys. Acta 421:334-337 (1976)). Además, dado que la mayoría de las enzimas están diseñadas para funcionar en condiciones anaerobias, puede requerirse menos diseño por ingeniería genética de enzimas con respecto a enzimas en la familia de complejo de 2-ceto-ácido deshidrogenasa para obtener una actividad en un entorno anaerobio.

ST2300 NP_378302.1 *Sulfolobus tokodaii* 7

1.2.1.d - Oxidoreductasa (fosforilación/desfosforilación)

Las enzimas a modo de ejemplo en esta clase incluyen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que convierte gliceraldehído-3-fosfato en D-glicerato 1,3-bisfosfato (por ejemplo, gapA *E. coli* (Branlant y Branlant Eur. J. Biochem. 150:61-66(1985)), aspartato-semialdehído deshidrogenasa que convierte L-aspartato-4-semialdehído en L-4-aspartil-fosfato (por ejemplo, asd de *E. coli* (Biellmann *et al.* Eur. J. Biochem. 104:53-58 (1980)), N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa que convierte N-acetil-L-glutamato-5-semialdehído en N-acetil-L-glutamil-5-fosfato (por ejemplo, argC de *E. coli* (Parsot *et al.* Gene 68:275-283 (1988)), y glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa que convierte L-glutamato-5-semialdehído en L-glutamil-5-fosfato (por ejemplo, proA de *E. coli* (Smith *et al.* J. Bacteriol. 157:545-551 (1984))).

gapA	P0A9B2.2	<i>Escherichia coli</i>
asd	NP_417891.1	<i>Escherichia coli</i>
argC	NP_418393.1	<i>Escherichia coli</i>
proA	NP_414778.1	<i>Escherichia coli</i>

1.3.1.a - Oxidoreductasa que funciona sobre donadores de CH-CH

Una enoil-CoA reductasa a modo de ejemplo es el producto génico de bcd de *C. acetobutylicum* (Atsumi *et al.* Metab Eng (2007); Boynton *et al.* Journal of Bacteriology 178:3015-3024 (1996), que cataliza de manera natural la reducción de crotonil-CoA para dar butiril-CoA. La actividad de esta enzima puede potenciarse expresando bcd junto con la expresión de los genes etfAB de *C. acetobutylicum*, que codifican para una flavoproteína de transferencia de electrones. Un candidato adicional para la etapa de enoil-CoA reductasa es la enoil-CoA reductasa mitocondrial de *E. gracilis* (Hoffmeister *et al.* Journal of Biological Chemistry 280:4329-4338 (2005)). Se clonó un constructo derivado de esta secuencia tras la retirada de su secuencia líder de direccionamiento mitocondrial en *E. coli* dando como

resultado una enzima activa (Hoffmeister *et al.*, citado anteriormente, (2005)). Este enfoque lo conocen bien los expertos en la técnica de expresión de genes eucariotas, particularmente aquellos con secuencias líder que pueden dirigir el producto génico a un compartimento intracelular específico, en organismos procariotas. Un homólogo cercano de este gen, TDE0597, del procariota *Treponema denticola* representa una tercera enoil-CoA reductasa que se ha clonado y expresado en *E. coli* (Tucci y Martin FEBS Letters 581:1561-1566 (2007)).

bcd	NP_349317.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
etfA	NP_349315.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
etfB	NP_349316.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
TER	Q5EU90.1	<i>Euglena gracilis</i>
TDE0597	NP_971211.1	<i>Treponema denticola</i>

Se sabe que enzimas 2-enoato reductasa (EC 1.3.1.31) a modo de ejemplo catalizan la reducción dependiente de NADH de una amplia variedad de aldehídos y ácidos carboxílicos α,β -insaturados (Rohdich *et al.* J. Biol. Chem. 276:5779-5787 (2001)). 2-Enoato reductasa se codifica por enr en varias especies de *Clostridia* (Giesel y Simon Arch Microbiol. 135(1): págs. 51-57 (2001) incluyendo *C. tyrobutyricum*, y *C. thermoaceticum* (ahora denominada *Moorella thermoaceticum*) (Rohdich *et al.*, citado anteriormente, (2001)). En la secuencia genómica recientemente publicada de *C. kluyveri*, se han notificado 9 secuencias codificantes para enoato reductasas, de las cuales se ha caracterizado una (Seedorf *et al.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105(6):2128-33 (2008)). Se han clonado los genes enr tanto de *C. tyrobutyricum* como de *C. thermoaceticum* y se han secuenciado y muestran una identidad del 59% entre sí. También se encuentra que el primer gen tiene una similitud de aproximadamente el 75% con respecto al gen caracterizado en *C. kluyveri* (Giesel y Simon Arch Microbiol 135(1):51-57 (1983)). Basándose en estos resultados de secuencias se ha notificado que enr es muy similar a la dienil CoA reductasa en *E. coli* (fadH) (163 Rohdich *et al.*, citado anteriormente (2001)). También se ha expresado el gen enr de *C. thermoaceticum* en una forma enzimáticamente activa en *E. coli* (163 Rohdich *et al.*, citado anteriormente (2001)).

fadH	NP_417552.1	<i>Escherichia coli</i>
enr	ACA54153.1	<i>Clostridium botulinum</i> A3 str
enr	CAA71086.1	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
enr	CAA76083.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
enr	YP_430895.1	<i>Moorella thermoacetica</i>

1.4.1.a - Oxidorreductasa que funciona sobre aminoácidos

La mayoría de las oxidorreductasas que funcionan sobre aminoácidos catalizan la desaminación oxidativa de alfa-aminoácidos con NAD⁺ o NADP⁺ como aceptor. Las oxidorreductasas a modo de ejemplo que funcionan sobre aminoácidos 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* (Korber *et al.* J. Mol. Biol. 234:1270-1273 (1993); McPherson y Wootton Nucleic. Acids Res. 11:5257-5266 (1983)), 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 amoniaco, al tiempo que favorecen NADP(H), NAD(H) o ambos, respectivamente. El gen ldh de *Bacillus cereus* codifica para la proteína LeuDH que tiene una amplia gama de sustratos incluyendo leucina, isoleucina, valina y 2-aminobutanoato (Ansorge y Kula Biotechnol Bioeng. 68:557-562 (2000); Stoyan *et al.* J. Biotechnol 54:77-80 (1997)). 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)).

gdhA	P00370	<i>Escherichia coli</i>
gdh	P96110.4	<i>Thermotoga maritima</i>
gdhA1	NP_279651.1	<i>Halobacterium salinarum</i>
ldh	POA393	<i>Bacillus cereus</i>
nadX	NP_229443.1	<i>Thermotoga maritima</i>

La lisina 6-deshidrogenasa (desaminación), codificada por el gen lysDH, cataliza la desaminación oxidativa del grupo ϵ -amino de L-lisina para formar 2-aminoadipato-6-semialdehído, que a su vez se cicla de manera no enzimática para formar Δ^1 -piperidein-6-carboxilato (Misono y Nagasaki J. Bacteriol. 150:398-401 (1982)). El gen lysDH de *Geobacillus stearothermophilus* codifica para una lisina 6-deshidrogenasa dependiente de NAD termófila (Heydari *et al.* Appl Environ. Microbiol 70:937-942 (2004)). Además, el gen lysDH de *Aeropyrum pernix* K1 se ha identificado mediante homología a partir de proyectos de genoma.

lysDH	AB052732	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
lysDH	NP_147035.1	<i>Aeropyrum pernix</i> K1
ldh	POA393	<i>Bacillus cereus</i>

2.3.1.a - Aciltransferasa (transferencia de grupo fosfato)

Las aciltransferasas de transferencia de fosfato a modo de ejemplo incluyen fosfotransacetilasa, codificada por pta, y fosfotransbutirilasa, codificada por ptb. El gen pta de *E. coli* codifica para una enzima que puede convertir acetil-CoA en acetil-fosfato, y viceversa (Suzuki, T. Biochim. Biophys. Acta 191:559-569 (1969)). Esta enzima también puede usar propionil-CoA en lugar de acetil-CoA formando propionato en el procedimiento (Hesslinger *et al.* Mol. Microbiol. 27:477-492 (1998)). De manera similar, el gen ptb de *C. acetobutylicum* codifica para una enzima que puede convertir butiril-CoA en butirilfosfato (Walter *et al.* Gene 134(1): págs. 107-11 (1993)); Huang *et al.* J Mol Microbiol Biotechnol 2(1): págs. 33-38 (2000). Pueden encontrarse genes ptb adicionales en la bacteria productora de butirato L2-50 (Louis *et al.* J. Bacteriol. 186:2099-2106 (2004)) y *Bacillus megaterium* (Vazquez *et al.* Curr. Microbiol. 42:345-349 (2001)).

pta	NP_416800.1	<i>Escherichia coli</i>
ptb	NP_349676	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
ptb	AAR19757.1	bacteria productora de butirato L2-50
ptb	CAC07932.1	<i>Bacillus megaterium</i>

2.6.1.a - Aminotransferasa

La aspartato aminotransferasa transfiere un grupo amino de aspartato a alfa-cetoglutarato, formando glutamato y oxaloacetato. Esta conversión se cataliza, 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. 113:83-89 (1985)), AAT2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Yagi *et al.* J Biochem. 92:35-43 (1982)) y ASP5 de *Arabidopsis thaliana* (48, 108, 225 48. de la *et al.* Plant J 46:414-425 (2006); Kwok y Hanson J Exp. Bot. 55:595-604 (2004); Wilkie y Warren Protein Expr. Purif. 12:381-389 (1998)). 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 y Berg 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 y Berg J. Bacteriol. 158:571-574 (1984)). El producto génico del serC de *E. coli* cataliza dos reacciones, fosfoserina aminotransferasa y fosfohidroxitreonina aminotransferasa (Lam y Winkler J. Bacteriol. 172:6518-6528 (1990)), y no pudo detectarse actividad sobre sustratos no fosforilados (Drewke *et al.* FEBS. Lett. 390:179-182 (1996)).

aspC	NP_415448.1	<i>Escherichia coli</i>
AAT2	P23542.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ASP5	P46248.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
avtA	YP_026231.1	<i>Escherichia coli</i>
serC	NP_415427.1	<i>Escherichia coli</i>

Cargill ha desarrollado una beta-alanina/alfa-cetoglutarato aminotransferasa para producir 3-HP a partir de beta-alanina a través de malonil-semialdehído (documento PCT/US2007/076252 (Jessen *et al.*)). También se mostró que el producto génico de SkPYD4 en *Saccharomyces kluyveri* usa preferiblemente beta-alanina como donador de grupo amino (Andersen *et al.* FEBS. J. 274:1804-1817 (2007)). SkUGA1 codifica para un homólogo de GABA aminotransferasa de *Saccharomyces cerevisiae*, UGA1 (Ramos *et al.* Eur. J. Biochem. 149:401-404 (1985)), mientras que SkPYD4 codifica para una enzima implicada en la transaminación tanto de β -alanina como de GABA (Andersen *et al.* FEBS. J. 274:1804-1817 (2007)). La 3-amino-2-metilpropionato transaminasa cataliza la transformación de semialdehído de metilmalonato en 3-amino-2-metilpropionato. La enzima se ha caracterizado en *Rattus norvegicus* y *Sus scrofa* y se codifica por Abat (Kakimoto *et al.* Biochim. Biophys. Acta 156:374-380 (1968); Tamaki *et al.* Methods Enzymol. 324:376-389 (2000)). Los candidatos enzimáticos en otros organismos con alta homología de secuencia con respecto a 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*, codificadas por el gen gabT, tiene una amplia especificidad de sustrato (Liu *et al.* Biochemistry 43:10896-10905 (2004); Schulz *et al.* Appl Environ Microbiol 56:1-6 (1990)). El producto génico de puuE cataliza la otra 4-aminobutirato transaminasa en *E. coli* (Kurihara *et al.* J. Biol. Chem. 280:4602-4608 (2005)).

SkyPYD4	ABF58893.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
SkUGA1	ABF58894.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
UGA1	NP_011533.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Abat	P50554.3	<i>Rattus norvegicus</i>
Abat	P80147.2	<i>Sus scrofa</i>
Gta-1	Q21217.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
gabT	P94427.1	<i>Bacillus subtilis</i>
gabT	P22256.1	<i>Escherichia coli</i> K12
puuE	NP_415818.1	<i>Escherichia coli</i> K12

Se han notificado las estructuras cristalinas de rayos X de 4-aminobutirato transaminasa de *E. coli* unida y no unida al inhibidor (Liu *et al.* Biochemistry 43:10896-10905 (2004)). Se estudiaron y sugirieron la unión a sustratos y especificidades de sustrato. Se estudiaron las funciones de residuos de sitio activo mediante mutagénesis dirigida al

sitio y cristalografía de rayos X (Liu *et al.* Biochemistry 44:2982-2992 (2005)). Basándose en la información estructural, se realizó un intento por diseñar por ingeniería genética 4-aminobutirato transaminasa de *E. coli* con actividad enzimática novedosa. Estos estudios proporcionan una base para hacer evolucionar la actividad transaminasa para rutas de BDO.

2.7.2.a - Fosfotransferasa, aceptor de grupo carboxilo

Las cinasas a modo de ejemplo incluyen la acetato cinasa de *E. coli*, codificada por *ackA* (Skarstedt y Silverstein J. Biol. Chem. 251:6775-6783 (1976)), las butirato cinasas de *C. acetobutylicum*, codificadas por *buk1* y *buk2* (Walter *et al.* Gene 134(1):107-111 (1993) (Huang *et al.* J Mol Microbiol Biotechnol 2(1):33-38 (2000)), y la gamma-glutamilo cinasa de *E. coli*, codificada por *proB* (Smith *et al.* J. Bacteriol. 157:545-551 (1984)). Estas enzimas fosforilan acetato, butirato y glutamato, respectivamente. El producto génico de *ackA* de *E. coli* también fosforila propionato (Hesslinger *et al.* Mol. Microbiol 27:477-492 (1998)).

<i>ackA</i>	NP_416799.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>buk1</i>	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>buk2</i>	Q97II1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>proB</i>	NP_414777.1	<i>Escherichia coli</i>

2.8.3.a - Coenzima-A transferasa

En la familia de CoA-transferasa, se ha mostrado que la enzima acil-CoA:acetato-CoA transferasa de *E. coli*, también conocida como acetato-CoA transferasa (EC 2.8.3.8), transfiere el resto CoA a acetato a partir de una variedad de sustratos acil-CoA ramificados y lineales, incluyendo isobutirato (Matthies y Schink Appl Environ Microbiol 58:1435-1439 (1992)), valerato (Vanderwinkel *et al.* Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908 (1968)) y butanoato (Vanderwinkel, citado anteriormente (1968)). Esta enzima se codifica por *atoA* (subunidad alfa) y *atoD* (subunidad beta) en *E. coli* sp. K12 (Korolev *et al.* Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr. 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel, citado anteriormente (1968)) y *actA* y *cg0592* en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Duncan *et al.* Appl Environ Microbiol 68:5186-5190 (2002)). Genes adicionales encontrados mediante homología de secuencia incluyen *atoD* y *atoA* en *Escherichia coli* UT189.

<i>atoA</i>	P76459.1	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>atoD</i>	P76458.1	<i>Escherichia coli</i> K12
<i>actA</i>	YP_226809.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
<i>atoA</i>	ABE07971.1	<i>Escherichia coli</i> UT189
<i>atoD</i>	ABE07970.1	<i>Escherichia coli</i> UT189

Transformaciones similares se catalizan por los productos génicos de *cat1*, *cat2* y *cat3* de *Clostridium kluyveri* que se ha mostrado que muestran actividad succinil-CoA, 4-hidroxiobutiril-CoA y butiril-CoA acetiltransferasa, respectivamente (Seedorf *et al.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105(6):2128-2133 (2008); Sohling y Gottschalk J Bacteriol 178(3):871-880 (1996)).

<i>cat1</i>	P38946.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat2</i>	P38942.2	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>cat3</i>	EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

La enzima glutaconato-CoA-transferasa (EC 2.8.3.12) de la bacteria anaerobia *Acidaminococcus fermentans* reacciona con diácido glutaconil-CoA y 3-butenoil-CoA (Mack y Buckel FEBS Lett. 405:209-212 (1997)). Los genes que codifican para esta enzima son *gctA* y *gctB*. Esta enzima tiene actividad reducida pero detectable con otros derivados de CoA incluyendo glutaril-CoA, 2-hidroxiglutaril-CoA, adipil-CoA y acrilil-CoA (Buckel *et al.* Eur. J. Biochem. 118:315-321 (1981)). Se ha clonado y expresado la enzima en *E. coli* (Mac *et al.* Eur. J. Biochem. 226:41-51 (1994)).

<i>gctA</i>	CAA57199.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>gctB</i>	CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>

3.1.2.a - Tioléster hidrolasa (específica de CoA)

En la familia de CoA hidrolasa, la enzima 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa es específica para 3-HIBCoA y se ha descrito que cataliza eficazmente la transformación deseada durante la degradación de valina (Shimomura *et al.* J Biol Chem 269:14248-14253 (1994)). Los genes que codifican para esta enzima incluyen *hibch* de *Rattus norvegicus* (Shimomura *et al.*, citado anteriormente (1994); Shimomura *et al.* Methods Enzymol. 324:229-240 (2000)) y *Homo sapiens* (Shimomura *et al.*, citado anteriormente, 2000). Los genes candidatos mediante homología de secuencia incluyen *hibch* de *Saccharomyces cerevisiae* y BC_2292 de *Bacillus cereus*.

hibch	Q5XIE6.2	<i>Rattus norvegicus</i>
hibch	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>
hibch	P28817.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BC_2292	Q81DR3	<i>Bacillus cereus</i>

La conversión de adipil-CoA en adipato puede llevarse a cabo mediante una acil-CoA hidrolasa o de manera equivalente una tioesterasa. El principal candidato génico de *E. coli* es tesB (Naggert *et al.* J Biol Chem. 266(17):11044-11050 (1991)) que muestra una alta similitud con respecto al acot8 humano que es una ácido dicarboxílico acetiltransferasa con actividad sobre adipil-CoA (Westin *et al.* J Biol Chem 280(46): 38125-38132 (2005). También se ha caracterizado esta actividad en el hígado de rata (Deana, Biochem Int. 26(4): págs. 767-773 (1992)).

tesB	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>
acot8	CAA15502	<i>Homo sapiens</i>
acot8	NP_570112	<i>Rattus norvegicus</i>

- 10 Otras posibles tioléster hidrolasas de *E. coli* incluyen los productos génicos de tesA (Bonner y Bloch, J Biol Chem. 247(10):3123-3133 (1972)), ybgC (Kuznetsova *et al.*, FEMS Microbiol Rev. 29(2):263-279 (2005); Zhuang *et al.*, FEBS Lett. 516(1-3):161-163 (2002)) paal (Song *et al.*, J Biol Chem. 281(16):11028-11038 (2006)) y ybdB (Leduc *et al.*, J Bacteriol. 189(19):7112-7126 (2007)).

tesA	NP_415027	<i>Escherichia coli</i>
ybgC	NP_415264	<i>Escherichia coli</i>
paal	NP_415914	<i>Escherichia coli</i>
ybdB	NP_415129	<i>Escherichia coli</i>

- 15 Varias acetil-CoA hidrolasas eucariotas (EC 3.1.2.1) tienen amplia especificidad de sustrato. La enzima de cerebro de *Rattus norvegicus* (Robinson *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 71:959-965 (1976)) puede reaccionar con butiril-CoA, hexanoil-CoA y malonil-CoA.

acot12	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>
--------	-------------	--------------------------

- 20 4.1.1.a - Carboxi-liasa

Una carboxi-liasa a modo de ejemplo es acetolactato descarboxilasa que participa en el catabolismo de citrato y la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, convirtiendo 2-acetolactato en acetoina. En *Lactococcus lactis* la enzima está compuesta por seis subunidades, codificadas por el gen aldB, y se activa mediante valina, leucina e isoleucina (Goupil *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 62:2636-2640 (1996); Goupil-Feuillerat *et al.* J. Bacteriol. 182:5399-5408 (2000)). Se ha sobreexpresado y caracterizado esta enzima en *E. coli* (Phalip *et al.* FEBS Lett. 351:95-99 (1994)). En otros organismos la enzima es un dímero, codificado por aldC en *Streptococcus thermophilus* (Monnet *et al.* Lett. Appl. Microbiol. 36:399-405 (2003)), aldB en *Bacillus brevis* (Diderichsen *et al.* J. Bacteriol. 172:4315-4321 (1990); Najmudin *et al.* Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1073-1075 (2003)) y budA de *Enterobacter aerogenes* (Diderichsen *et al.* J. Bacteriol. 172:4315-4321 (1990)). La enzima de *Bacillus brevis* se clonó y sobreexpresó en *Bacillus subtilis* y se caracterizó mediante cristalografía (Najmudin *et al.* Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59:1073-1075 (2003)). Adicionalmente, la enzima de *Leuconostoc lactis* se ha purificado y caracterizado, pero no se ha aislado el gen (O'Sullivan *et al.* FEMS Microbiol. Lett. 194:245-249 (2001)).

aldB	NP_267384.1	<i>Lactococcus lactis</i>
aldC	Q8L208	<i>Streptococcus thermophilus</i>
aldB	P23616.1	<i>Bacillus brevis</i>
budA	P05361.1	<i>Enterobacter aerogenes</i>

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 y Vorlop Appl Microbiol Biotechnol 56:289-295 (2001)). Aunque el itaconato es un compuesto de interés biotecnológico, hasta ahora no se ha notificado la secuencia de gen o proteína de aconitato descarboxilasa.

Se ha aislado y caracterizado 4-oxalocronato descarboxilasa de numerosos organismos. 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)), xiii y xiiiL de *Pseudomonas putida* (Kato y Asano Arch. Microbiol 168:457-463 (1997); Lian y Whitman J. Am. Chem. Soc. 116:10403-10411 (1994); Stanley *et al.* Biochemistry 39:3514 (2000)) 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.* J Bacteriol. 174:711-724 (1992)).

dmpH	CAA43228.1	<i>Pseudomonas sp. CF600</i>
------	------------	------------------------------

dmpE	CAA43225.1	<i>Pseudomonas sp. CF600</i>
xiiiI	YP_709328.1	<i>Pseudomonas putida</i>
xiiiII	YP_709353.1	<i>Pseudomonas putida</i>
Reut_B5691	YP_299880.1	<i>Ralstonia eutropha JMP134</i>
Reut_B5692	YP_299881.1	<i>Ralstonia eutropha JMP134</i>

Se ha caracterizado una clase adicional de descarboxilasas que catalizan para 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: pad 1 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); Qi *et al.* Metab Eng 9:268-276 (2007); Rodriguez *et al.* J. Agric. Food Chem. 56:3068-3072 (2008)), pofK (pad) de *Klebsiella oxytoca* (Hashidoko *et al.* Biosci. Biotech. Biochem. 58:217-218 (1994); Uchiyama *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:116-123 (2008)), *Pedococcus pentosaceus* (Barthelmebs *et al.* Appl Environ Microbiol 67:1063-1069 (2001)), y padC de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* (Lingen *et al.* Protein Eng 15:585-593 (2002)). También se ha purificado y caracterizado una ácido ferúlico descarboxilasa de *Pseudomonas fluorescens* (Huang *et al.* J. Bacteriol. 176:5912-5918 (1994)). De manera importante, se ha mostrado que esta clase de enzimas son estables y no requieren cofactores unidos de manera interna ni exógenos, haciendo por tanto que estas enzimas sean adecuadas de manera ideal para biotransformaciones (Sariaslani, Annu. Rev. Microbiol. 61:51-69 (2007)).

pad1	AB368798	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pdc	U63827	<i>Lactobacillus plantarum</i>
pofK (pad)	AB330293	<i>Klebsiella oxytoca</i>
padC	AF017117	<i>Bacillus subtilis</i>
pad	AJ276891	<i>Pedococcus pentosaceus</i>
pad	AJ278683	<i>Bacillus pumilus</i>

Enzimas descarboxilasa adicionales pueden formar semialdehído succínico a partir de alfa-cetoglutarato. Estas incluyen las enzimas alfa-cetoglutarato descarboxilasa de *Euglena gracilis* (Shigeoka *et al.* Biochem. J. 282(Pt 2):319-323 (1992); Shigeoka y Nakano Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991); Shigeoka y Nakano Biochem. J. 292 (Pt 2):463-467 (1993)), cuya secuencia génica correspondiente aún no se ha determinado, y de *Mycobacterium tuberculosis* (Tian *et al.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 102:10670-10675 (2005)). Además, las enzimas glutamato descarboxilasa pueden convertir glutamato en 4-aminobutirato tal como los productos de los genes gadA y gadB de *E. coli* (De Biase *et al.* Protein. Expr. Purif. 8:430-438 (1993)).

kgd	O50463.4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
gadA	NP_417974	<i>Escherichia coli</i>
gadB	NP_416010	<i>Escherichia coli</i>

Ceto-ácido descarboxilasas

La piruvato descarboxilasa (PDC, EC 4.1.1.1), también denominada ceto-ácido descarboxilasa, es una enzima clave en la fermentación alcohólica, que cataliza la descarboxilación de piruvato para dar acetaldehído. Esta enzima tiene una amplia gama de sustrato para 2-cetoácidos alifáticos incluyendo 2-cetobutirato, 2-cetovalerato, 3-hidroxipiruvato y 2-fenilpiruvato (Berg *et al.* Science 318:1782-1786 (2007)). La PDC de *Zymomonas mobilis*, codificada por pdc, se ha sometido a estudios de diseño por ingeniería genética directos que alteraron la afinidad por diferentes sustratos (Siegert *et al.* Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)). La PDC de *Saccharomyces cerevisiae* también se ha estudiado extensamente, se ha diseñado por ingeniería genética para determinar una actividad alterada, y se ha expresado funcionalmente en *E. coli* (Killenberg-Jabs *et al.* Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001); Li y Jordan Biochemistry 38:10004-10012 (1999); ter Schure *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307 (1998)). La estructura cristalina de esta enzima está disponible (Killenberg-Jabs Eur. J. Biochem. 268:1698-1704 (2001)). Otros candidatos de PDC bien caracterizados 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)).

Gen	ID de GenBank	Organismo
pdc	P06672.1	<i>Zymomonas mobilis</i>
pdc1	P06169	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pdc	Q8L388	<i>Acetobacter pasteurians</i>
pdc1	Q12629	<i>Kluyveromyces lactis</i>

Al igual que PDC, la benzoilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7) tiene una amplia gama de sustrato y ha sido objeto de estudios de diseño por ingeniería genética de enzimas. La enzima de *Pseudomonas putida* se ha estudiado extensamente y están disponibles estructuras cristalinas de esta enzima (Hasson *et al.* Biochemistry 37:9918-9930 (1998); Polovnikova *et al.* Biochemistry 42:1820-1830 (2003)). La mutagénesis dirigida al sitio de dos residuos en el sitio activo de la enzima de *Pseudomonas putida* alteró la afinidad (K_m) de sustratos que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural (Siegert Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005)). Las propiedades

de esta enzima se han modificado adicionalmente mediante diseño por ingeniería genética dirigido (Lingen *et al.* Protein Eng 15:585-593 (2002)); Lingen Chembiochem 4:721-726 (2003)). La enzima de *Pseudomonas aeruginosa*, codificada por mdIC, también se ha caracterizado de manera experimental (Barrowman *et al.* FEMS Microbiology Letters 34:57-60 (1986)). Pueden deducirse candidatos génicos adicionales de *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* y otros organismos mediante 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)).

mdIC	P20906.2	<i>Pseudomonas putida</i>
mdIC	Q9HUR2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
dpgB	ABN80423.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
ilvB-1	YP_260581.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

4.2.1.a - Hidro-liasas

La 2-(hidroximetil)glutarato deshidratasa de *Eubacterium barkeri* es una hidro-liasas a modo de ejemplo. Esta enzima se ha estudiado en el contexto del catabolismo de nicotinato y se codifica por hmd (Alhapel *et al.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 103:12341-12346 (2006)). Se encuentran enzimas similares con alta homología de secuencia en *Bacteroides capillosus*, *Anaerotruncus colihominis* y *Natranaerobius thermophilus*.

hmd	ABC88407.1	<i>Eubacterium barkeri</i>
BACCAP_02294	ZP_02036683.1	<i>Bacteroides capillosus</i> ATCC 29799
ANACOL_02527	ZP_02443222.1	<i>Anaerotruncus colihominis</i> DSM 17241
NtherDRAFT_2368	ZP_02852366.1	<i>Natranaerobius thermophilus</i> JW/NM-WN-LF

Una segunda hidro-liasas a modo de ejemplo es fumarato hidratasa, una enzima que cataliza la deshidratación de malato para dar fumarato. Se dispone de una gran cantidad de información estructural para esta enzima e investigadores han diseñado satisfactoriamente por ingeniería genética la enzima para alterar la actividad, inhibición y localización (Weaver, T. Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr. 61:1395-1401 (2005)). Las fumarato hidratatas adicionales incluyen las codificadas por fumC de *Escherichia coli* (Estevez *et al.* Protein Sci. 11:1552-1557 (2002); Hong y Lee Biotechnol. Bioprocess Eng. 9:252-255 (2004); Rose y Weaver Proc Natl Acad Sci U.S.A. 101:3393-3397 (2004)), *Campylobacter jejuni* (Smith *et al.* Int. J Biochem. Cell Biol 31:961-975 (1999)) y *Thermus thermophilus* (Mizobata *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 355:49-55 (1998)), y fumH de *Rattus norvegicus* (Kobayashi *et al.* J Biochem. 89:1923-1931(1981)). Las enzimas similares con alta homología de secuencia incluyen fum1 de *Arabidopsis thaliana* y fumC de *Corynebacterium glutamicum*.

fumC	P05042.1	<i>Escherichia coli</i> K12
fumC	069294.1	<i>Campylobacter jejuni</i>
fumC	P84127	<i>Thermus thermophilus</i>
fumH	P14408.1	<i>Rattus norvegicus</i>
fum1	P93033.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
fumC	Q8NRN8.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>

La citramalato hidrolisas, también denominada 2-metilmalato deshidratasa, convierte 2-metilmalato en mesaconato. Se detectó actividad 2-metilmalato deshidratasa en *Clostridium tetanomorphum*, *Morganella morganii*, *Citrobacter amalonaticus* en el contexto de la ruta de degradación de glutamato VI (Kato y Asano Arch. Microbiol 168:457-463 (1997)); sin embargo hasta ahora no se han secuenciado los genes que codifican para esta enzima.

El producto génico de crt de *C. acetobutylicum* cataliza la deshidratación de 3-hidroxi-butil-CoA para dar crotonil-CoA (Atsumi *et al.* Metab Eng. 29 (2007)); Boynton *et al.* Journal of Bacteriology 178:3015-3024 (1996)). Se cree 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 U S A 95(11):6419-6424 (1998)). paaA y paaB de *P. fluorescens* catalizan transformaciones análogas (14 Olivera *et al.*, citado anteriormente, 1998). Por último, se ha mostrado que varios genes de *Escherichia coli* demuestran funcionalidad enoil-CoA hidratasa incluyendo maoC (Park y Lee J Bacteriol 185(18):5391-5397 (2003)), paaF (Park y Lee Biotechnol Bioeng. 86(6):681-686 (2004a)); Park y Lee Appl Biochem Biotechnol. 113-116: 335-346 (2004b)); Ismail *et al.* Eur J Biochem 270(14):p. 3047-3054 (2003) y paaG (Park y Lee, citado anteriormente, 2004; Park y Lee citado anteriormente, 2004b; Ismail *et al.*, citado anteriormente, 2003).

maoC	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
paaF	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
paaG	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>
crt	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
paaA	NP_745427.1	<i>Pseudomonas putida</i>
paaB	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>
phaA	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

phaB ABF82234.1 *Pseudomonas fluorescens*

Los genes fadA y fadB de *E. coli* codifican para un complejo multienzimático que muestra actividades cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa (Yang *et al.* Biochemistry 30(27): págs. 6788-6795 (1991); Yang *et al.* J Biol Chem 265(18): págs. 10424-10429 (1990); Yang *et al.* J Biol Chem 266(24): pág. 16255 (1991); Nakahigashi e Inokuchi Nucleic Acids Res 18(16): pág. 4937 (1990)). Los genes fadI y fadJ codifican para funciones similares y de manera natural sólo se expresan de manera anaerobia (Campbell *et al.* Mol Microbiol 47(3): págs. 793-805 (2003)). Anteriormente se ha descrito un método para producir poli[(R)-3-hidroxibutirato] en *E. coli* que implica activar fadB (mediante desactivación de un regulador negativo, fadR) y expresar conjuntamente una cetotiolasa no nativa (phaA de *Ralstonia eutropha*) (Sato *et al.* J Biosci Bioeng 103(1): 38-44 (2007)). Este trabajo demuestra que una enzima de β -oxidación, en particular el producto génico de fadB que codifica para actividades tanto de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa como de enoil-CoA hidratasa, puede funcionar como parte de una ruta para producir moléculas de cadena más larga a partir de precursores de acetil-CoA.

fadA	YP_026272.1	<i>Escherichia coli</i>
fadB	NP_418288.1	<i>Escherichia coli</i>
fadI	NP_416844.1	<i>Escherichia coli</i>
fadJ	NP_416843.1	<i>Escherichia coli</i>
fadR	NP_415705.1	<i>Escherichia coli</i>

4.3.1.a - Amoniaco-liasa

La aspartasa (EC 4.3.1.1), que cataliza la desaminación de aspartato para dar fumarato, es una enzima ampliamente extendida en microorganismos, y se ha caracterizado de manera extensa (Viola, R. E. Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol 74:295-341 (2000)). Se ha resuelto la estructura cristalina de la aspartasa de *E. coli*, codificada por aspA (Shi *et al.* Biochemistry 36:9136-9144 (1997)). También se ha mostrado que la enzima de *E. coli* reacciona con sustratos alternativos éster fenilmetílico de aspartato, asparagina, bencil-aspartato y malato (Ma *et al.* Ann N.Y. Acad Sci 672:60-65 (1992)). En un estudio separado, se ha empleado evolución dirigida con 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.* Biochim. Biophys. Acta 1324:182-190 (1997)), *Pseudomonas fluorescens* (Takagi *et al.* J. Biochem. 96:545-552 (1984)), *Bacillus subtilis* (Sjostrom *et al.* Biochim. Biophys. Acta 1324:182-190 (1997)) y *Serratia marcescens* (Takagi y Kisumi J Bacteriol. 161:1-6 (1985)).

aspA	NP_418562	<i>Escherichia coli</i> K12 subsp. MG1655
aspA	P44324.1	<i>Haemophilus influenzae</i>
aspA	P07346.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
ansB	P26899.1	<i>Bacillus subtilis</i>
aspA	P33109.1	<i>Serratia marcescens</i>

La 3-metilaspartasa (EC 4.3.1.2), también conocida como beta-metilaspartasa o 3-metilaspartato amoniaco-liasa, cataliza la desaminación de treo-3-metilaspartato para dar mesaconato. La 3-metilaspartasa de *Clostridium tetanomorphum* se ha clonado, se ha expresado funcionalmente en *E. coli*, y se ha cristalizado (Asuncion *et al.* Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr. 57:731-733 (2001); Asuncion *et al.* J Biol Chem. 277:8306-8311 (2002); Botting *et al.* Biochemistry 27:2953-2955 (1988); Goda *et al.* Biochemistry 31:10747-10756 (1992)). En *Citrobacter amalonaticus*, esta enzima se codifica por BAA28709 (Kato y Asano Arch. Microbiol 168:457-463 (1997)). También se ha cristalizado 3-metilaspartasa a partir de YG1002 de *E. coli* (Asano y Kato FEMS Microbiol Lett. 118:255-258 (1994)) aunque no se indica la secuencia de proteína en bases de datos públicas tales como GenBank. Puede usarse homología de secuencia para identificar genes candidatos adicionales, incluyendo CTC_02563 en *C. tetani* y ECs0761 en *Escherichia coli* O157:H7.

MAL	AAB24070.1	<i>Clostridium tetanomorphum</i>
BAA28709	BAA28709.1	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
CTC_02563	NP_783085.1	<i>Clostridium tetani</i>
ECs0761	BAB34184.1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 cepa Sakai

Los candidatos enzimáticos de amoniaco-liasa que forman productos de enoil-CoA incluyen beta-alanil-CoA amoniaco-liasa (EC 4.3.1.6), que desamina beta-alanil-CoA, y 3-aminobutiril-CoA amoniaco-liasa (EC 4.3.1.14). Se han identificado dos beta-alanil-CoA amoniaco liasas y se han caracterizado en *Clostridium propionicum* (Herrmann *et al.* FEBS J. 272:813-821 (2005)). Hasta ahora no se ha estudiado ninguna otra beta-alanil-CoA amoniaco liasa, pero pueden identificarse candidatos génicos mediante similitud de secuencia. Un candidato de este tipo es MXAN_4385 en *Myxococcus xanthus*.

ac12	CAG29275.1	<i>Clostridium propionicum</i>
ac11	CAG29274.1	<i>Clostridium propionicum</i>
MXAN_4385	YP_632558.1	<i>Myxococcus xanthus</i>

5.3.3.a - Isomerasa

Las 4-hidroxi-butiril-CoA deshidratasas tanto de *Clostridium aminobutyrium* como de *C. kluyveri* catalizan la conversión reversible de 4-hidroxi-butiril-CoA en crotonil-CoA y presentan una actividad vinilacetil-CoA Δ -isomerasa intrínseca (Scherf y Buckel Eur. J Biochem. 215:421-429 (1993); Scherf *et al.* Arch. Microbiol 161:239-245 (1994)). Se purificaron y caracterizaron ambas enzimas nativas, incluyendo las secuencias de aminoácidos N-terminales (Scherf y Buckel, citado anteriormente, 1993; Scherf *et al.*, citado anteriormente, 1994). Los genes abfD de *C. aminobutyrium* y *C. kluyveri* coinciden exactamente con estas secuencias de aminoácidos N-terminales, por tanto codifican para las 4-hidroxi-butiril-CoA deshidratasas/vinilacetil-CoA Δ -isomerasa. Además, el gen abfD de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 se identifica mediante homología a partir de proyectos de genoma.

abfD	YP_001396399.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555
abfD	P55792	<i>Clostridium aminobutyricum</i>
abfD	YP_001928843	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277

5.4.3.a - Aminomutasa

La lisina 2,3-aminomutasa (EC 5.4.3.2) es una aminomutasa a modo de ejemplo que convierte lisina en (3S)-3,6-diaminohexanoato, desplazando un grupo amina de la posición 2 a la 3. La enzima se encuentra en bacterias que fermentan lisina para dar acetato y butirato, incluyendo *Fusobacterium nucleatum* (kamA) (Barker *et al.* J. Bacteriol. 152:201-207 (1982)) y *Clostridium subterminale* (kamA) (Chirpich *et al.* J. Biol. Chem. 245:1778-1789 (1970)). La enzima de *Clostridium subterminale* se ha cristalizado (Lepore *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:13819-13824 (2005)). Una enzima que codifica para esta función también se codifica por yodO en *Bacillus subtilis* (Chen *et al.* Biochem. J. 348 Pt 3:539-549 (2000)). La enzima usa piridoxal 5'-fosfato como cofactor, requiere activación mediante S-adenosilmetionina, y es estereoselectiva, reaccionando únicamente con L-lisina. No se ha mostrado que la enzima reaccione con sustratos alternativos.

yodO	O34676.1	<i>Bacillus subtilis</i>
kamA	Q9XBQ8.1	<i>Clostridium subterminale</i>
kamA	Q8RHX4	<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i>

Una segunda aminomutasa, beta-lisina 5,6-aminomutasa (EC 5.4.3.3), cataliza la siguiente etapa de la fermentación de lisina para dar acetato y butirato, que transforma (3S)-3,6-diaminohexanoato en (3S,5S)-3,5-diaminohexanoato, desplazando un grupo amina terminal de la posición 6 a la 5. Esta enzima también cataliza la conversión de lisina en 2,5-diaminohexanoato y también se denomina lisina-5,6-aminomutasa (EC 5.4.3.4). La enzima se ha cristalizado en *Clostridium sticklandii* (kamD, kamE) (Berkovitch *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:15870-15875 (2004)). También se ha caracterizado la enzima de *Porphyromonas gingivalis* (Tang *et al.* Biochemistry 41:8767-8776 (2002)).

kamD	AAC79717.1	<i>Clostridium sticklandii</i>
kamE	AAC79718.1	<i>Clostridium sticklandii</i>
kamD	NC_002950.2	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83
kamE	NC_002950.2	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83

La ornitina 4,5-aminomutasa (EC 5.4.3.5) convierte D-ornitina en 2,4-diaminopentanoato, desplazando también una amina terminal al carbono adyacente. La enzima de *Clostridium sticklandii* se codifica por dos genes, oraE y oraS, y se ha clonado, secuenciado y expresado en *E. coli* (Chen *et al.* J. Biol. Chem. 276:44744-44750 (2001)). Hasta la fecha no se ha caracterizado esta enzima en otros organismos.

oraE	AAK72502	<i>Clostridium sticklandii</i>
oraS	AAK72501	<i>Clostridium sticklandii</i>

La tirosina 2,3-aminomutasa (EC 5.4.3.6) participa en la biosíntesis de tirosina, convirtiendo de manera reversible tirosina en 3-amino-3-(4-hidroxifenil)propanoato mediante desplazamiento de una amina de la posición 2 a la 3. En *Streptomyces globisporus*, también se ha mostrado que la enzima reacciona con derivados de tirosina (Christenson *et al.* Biochemistry 42:12708-12718 (2003)). No se dispone de información de secuencia.

La leucina 2,3-aminomutasa (EC 5.4.3.7) convierte L-leucina en beta-leucina durante la degradación y biosíntesis de la leucina. Un ensayo para leucina 2,3-aminomutasa detectó actividad en muchos organismos (Poston, J. M. Methods Enzymol. 166:130-135 (1988)), pero hasta la fecha no se han identificado genes que codifican para la enzima.

Cargill ha desarrollado una enzima 2,3-aminomutasa novedosa para convertir L-alanina en β -alanina, creando por tanto una ruta de piruvato a 3-HP en cuatro etapas bioquímicas (Liao *et al.*, publicación estadounidense n.º 2005-0221466).

6.2.1.a - Ácido-tiol ligasa

Una ácido-tiol ligasa a modo de ejemplo son los productos génicos de sucCD de *E. coli*, que, en conjunto, catalizan la formación de succinil-CoA a partir de succinato con el consumo simultáneo de un ATP, una reacción que es reversible *in vivo* (Buck *et al.* Biochemistry 24(22): págs. 6245-6252 (1985)). Las CoA-ligasas a modo de ejemplo adicionales incluyen la dicarboxilato-CoA ligasa de rata de la que aún no se ha caracterizado la secuencia (Vamecq *et al.* Biochem J. 230(3): págs. 683-693 (1985)), cualquiera de las dos fenilacetato-CoA ligasas caracterizadas de *P. chrysogenum* (Lamas-Maceiras *et al.* Biochem J 395(1):147-155 (2006); Wang *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 360(2):453-458 (2007)), la fenilacetato-CoA ligasa de *Pseudomonas putida* (Martinez-Blanco *et al.* J Biol Chem. 265(12):7084-7090 (1990)), y la 6-carboxihexanoato-CoA ligasa de *Bacillus subtilis* (Bower *et al.* J Bacteriol 178(14):4122-4130 (1996)).

sucC	NP 415256.1	<i>Escherichia coli</i>
sucD	AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>
phl	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
phlB	ABS19624.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
paaF	AAC24333.2	<i>Pseudomonas putida</i>
bioW	NP 390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>

EJEMPLO V

Ruta de BDO a modo de ejemplo a partir de succinil-CoA

Este ejemplo describe rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de succinil-CoA.

En el presente documento se describen rutas de BDO a partir de succinil-CoA y se han descrito anteriormente (véanse la solicitud estadounidense con n.º de serie 12/049.256, presentada el 14 de marzo de 2008, y la solicitud PCT con n.º de serie US08/57168, presentada el 14 de marzo de 2008). En la figura 8A se muestran rutas adicionales. En la tabla 15 se indican enzimas de tales rutas de BDO a modo de ejemplo, junto con genes a modo de ejemplo que codifican para estas enzimas.

En resumen, puede convertirse succinil-CoA en semialdehído succínico mediante succinil-CoA reductasa (o succinato semialdehído deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b). Puede convertirse succinato semialdehído en 4-hidroxiobutirato mediante 4-hidroxiobutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.a), tal como se describió anteriormente. Alternativamente, puede convertirse succinil-CoA en 4-hidroxiobutirato mediante succinil-CoA reductasa (formación de alcohol) (EC 1.1.1.c). Puede convertirse 4-hidroxiobutirato en 4-hidroxiobutiril-CoA mediante 4-hidroxiobutiril-CoA transferasa (EC 2.8.3.a), tal como se describió anteriormente, o mediante 4-hidroxiobutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o 4-hidroxiobutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxiobutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). Alternativamente, puede convertirse 4-hidroxiobutirato en 4-hidroxiobutiril-fosfato mediante 4-hidroxiobutirato cinasa (EC 2.7.2.a), tal como se describió anteriormente. Puede convertirse 4-hidroxiobutiril-fosfato en 4-hidroxiobutiril-CoA mediante fosfotrans-4-hidroxiobutirilasa (EC 2.3.1.a), tal como se describió anteriormente. Alternativamente, puede convertirse 4-hidroxiobutiril-fosfato en 4-hidroxiobutanal mediante 4-hidroxiobutanal deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1.2.1.d). Puede convertirse 4-hidroxiobutiril-CoA en 4-hidroxiobutanal mediante 4-hidroxiobutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxiobutanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b). Alternativamente, puede convertirse 4-hidroxiobutiril-CoA en 1,4-butanodiol mediante 4-hidroxiobutiril-CoA reductasa (formación de alcohol) (EC 1.1.1.c). Puede convertirse 4-hidroxiobutanal en 1,4-butanodiol mediante 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a), tal como se describió anteriormente.

TABLA 15. Ruta de BDO a partir de succinil-CoA.

Figura	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID de GenBank (si disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
8A	1.2.1.b	succinil-CoA	semialdehído succínico	succinil-CoA reductasa (o semialdehído deshidrogenasa)	sucD	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinil-CoA
					sucD	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>	malonil-CoA
8A	1.1.1.a	succinato semialdehído	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	4hbd	YP_726053.1	<i>Ralstonia eutropha H16</i>	4-hidroxibutirato
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	4-hidroxibutirato
					4hbd	Q94B07	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4-hidroxibutirato
8A	1.1.1.c	succinil-CoA	4-hidroxibutirato	succinil-CoA reductasa (formación de alcohol)	adhE2	AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanoil-CoA
					mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>	acil-CoA de cadena larga
8A	2.8.3.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA transferasa	cat1, cat2, cat3	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	<i>Escherichia coli</i>	butanoato
8A	3.1.2.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa	tesB	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>	3-hidroxipropanoil-CoA
8A	6.2.1.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa)	suc CD	NP_415256.1, AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>	succinato
					phl	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>	6-

8A	2.7.2.a	4-hidroxiubutirato	4-hidroxiubutirilfosfato	4-hidroxiubutirato cinasa	ackA	NP_416799.1	<i>Escherichia coli</i>	carboxihexanoato acetato, propionato
					buk1	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butirato
					buk2	Q97111	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butirato
8A	2.3.1.a	4-hidroxiubutiril-fosfato	4-hidroxiubutiril-CoA	fosfo-trans-4-hidroxiubutirilasa	ptb	NP_349676	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butiril-fosfato
					ptb	AAR19757.1	bacteria productora de butirato L2-50	butiril-fosfato
					ptb	CAC07932.1	<i>Bacillus megaterium</i>	butiril-fosfato
8A	1.2.1.d	4-hidroxiubutiril-fosfato	4-hidroxiubutanol	4-hidroxiubutanol deshidrogenasa (fosforilación)	asd	NP_417891.1	<i>Escherichia coli</i>	L-4-aspartilfosfato
					proA	NP_414778.1	<i>Escherichia coli</i>	L-glutamil-5-fosfato
					gapA	POA9B2.2	<i>Escherichia coli</i>	Gliceraldehido-3-fosfato
8A	1.2.1.b	4-hidroxiubutiril-CoA	4-hidroxiubutanol	4-hidroxiubutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxiubutanol deshidrogenasa)	sucD	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinil-CoA
					sucD	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	<i>Metallospira sedula</i>	malonil-CoA
8A	1.1.1.c	4-hidroxiubutiril-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxiubutiril-CoA reductasa (formación de alcohol)	adhE2	AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanol-CoA
					mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>	acil-CoA de cadena larga
8A	1.1.1.a	4-hidroxiubutanol	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Succinato semialdehído

EJEMPLO VI

Rutas de BDO a modo de ejemplo adicionales a partir de alfa-cetoglutarato

Este ejemplo describe rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de alfa-cetoglutarato.

En el presente documento se describen rutas de BDO a partir de succinil-CoA y se han descrito anteriormente (véanse la solicitud estadounidense con n.º de serie 12/049.256, presentada el 14 de marzo de 2008, y la solicitud PCT con n.º de serie US08/57168, presentada el 14 de marzo de 2008). En la figura 8B se muestran rutas adicionales. En la tabla 16 se indican enzimas de tales rutas de BDO a modo de ejemplo, junto con genes a modo de ejemplo que codifican para estas enzimas.

En resumen, puede convertirse alfa-cetoglutarato en semialdehído succínico mediante alfa-cetoglutarato descarboxilasa (EC 4.1.1.a), tal como se describió anteriormente. Alternativamente, puede convertirse alfa-cetoglutarato en glutamato mediante glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.a). Puede convertirse 4-aminobutirato en semialdehído succínico mediante 4-aminobutirato oxidoreductasa (desaminación) (EC 1.4.1.a) o 4-aminobutirato transaminasa (EC 2.6.1.a). Puede convertirse glutamato en 4-aminobutirato mediante glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.a). Puede convertirse succinato semialdehído en 4-hidroxibutirato mediante 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (EC 1.1.1.a), tal como se describió anteriormente. Puede convertirse 4-hidroxibutirato en 4-hidroxibutiril-CoA mediante 4-hidroxibutiril-CoA transferasa (EC 2.8.3.a), tal como se describió anteriormente, o mediante 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a), o 4-hidroxibutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). Puede convertirse 4-hidroxibutirato en 4-hidroxibutiril-fosfato mediante 4-hidroxibutirato cinasa (EC 2.7.2.a). Puede convertirse 4-hidroxibutiril-fosfato en 4-hidroxibutiril-CoA mediante fosfotrans-4-hidroxibutirilasa (EC 2.3.1.a), tal como se describió anteriormente. Alternativamente, puede convertirse 4-hidroxibutiril-fosfato en 4-hidroxibutanal mediante 4-hidroxibutanal deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1.2.1.d). Puede convertirse 4-hidroxibutiril-CoA en 4-hidroxibutanal mediante 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b), tal como se describió anteriormente. Puede convertirse 4-hidroxibutiril-CoA en 1,4-butanodiol mediante 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol) (EC 1.1.1.c). Puede convertirse 4-hidroxibutanal en 1,4-butanodiol mediante 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a), tal como se describió anteriormente.

TABLA 16. Ruta de BDO a partir de alfa-cetoglutarato.

Figura	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID de GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
8B	4.1.1.a	alfa-cetoglutarato	semialdehído succínico	alfa-cetoglutarato descarboxilasa	kgd	O50463.4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	alfa-cetoglutarato
					gadA	NP_417974	<i>Escherichia coli</i>	glutamato
					gadB	NP_416010	<i>Escherichia coli</i>	glutamato
8B	1.4.1.a	alfa-cetoglutarato	glutamato	glutamato deshidrogenasa	gdhA	P00370	<i>Escherichia coli</i>	glutamato
					gdh	P96110.4	<i>Thermotoga maritima</i>	glutamato
					gdhA1	NP_279651.1	<i>Halobacterium salinarum</i>	glutamato
8B	1.4.1.a	4-aminobutirato	semialdehído succínico	4-aminobutirato oxidoreductasa (desaminación)	lysDH	AB052732	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	lisina
					lysDH	NP_147035.1	<i>Aeropyrum pernix K1</i>	lisina
					ldh	P0A393	<i>Bacillus cereus</i>	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanoato
8B	2.6.1.a	4-aminobutirato	semialdehído succínico	4-aminobutirato transaminasa	gabT	P22256.1	<i>Escherichia coli</i>	4-aminobutirato
					puuE	NP_415818.1	<i>Escherichia coli</i>	4-aminobutirato
					UGA1	NP_011533.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4-aminobutirato
8B	4.1.1.a	glutamato	4-aminobutirato	glutamato descarboxilasa	gadA	NP_417974	<i>Escherichia coli</i>	glutamato
					gadB	NP_416010	<i>Escherichia coli</i>	glutamato
					kgd	O50463.4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	alfa-cetoglutarato
8B	1.1.1.a	succinato semialdehído	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutirato deshidrogenasa	4hbd	YP_726053.1	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	4-hidroxibutirato
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	4-hidroxibutirato
					4hbd	Q94B07	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4-hidroxibutirato
8B	2.8.3.a	4-hidroxibutirato	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA transferasa	cat1, cat2, cat3	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1,	<i>Acidaminococcus</i>	glutarato

[illegible]

8B	1.1.1.c	4-hidroxiubutiril-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxiubutiril-CoA reductasa (formación de alcohol)	adhE2	AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanoil-CoA
					mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>	acil-CoA de cadena larga
8B	1.1.1.a	4-hidroxiubutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Succinato semialdehído

EJEMPLO VII

Rutas de BDO a partir de 4-aminobutirato

5 Este ejemplo describe rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de 4-aminobutirato.

La figura 9A representa rutas de BDO a modo de ejemplo en las que se convierte 4-aminobutirato en BDO. En la tabla 17 se indican enzimas de una ruta de BDO a modo de ejemplo de este tipo, junto con genes a modo de ejemplo que codifican para estas enzimas.

10 En resumen, puede convertirse 4-aminobutirato en 4-aminobutiril-CoA mediante 4-aminobutirato CoA transferasa (EC 2.8.3.a), 4-aminobutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a), o 4-aminobutirato-CoA ligasa (o 4-aminobutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). Puede convertirse 4-aminobutiril-CoA en 4-oxobutiril-CoA mediante 4-aminobutiril-CoA oxidoreductasa (desaminación) (EC 1.4.1.a) o 4-aminobutiril-CoA transaminasa (EC 2.6.1.a). Puede convertirse 4-oxobutiril-CoA en 4-hidroxi-
15 butiril-CoA mediante 4-hidroxi-
butiril-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.a). Puede convertirse 4-hidroxi-
butiril-CoA en 1,4-butanodiol mediante 4-hidroxi-
butiril-CoA reductasa (formación de alcohol) (EC 1.1.1.c). Alternativamente, puede convertirse 4-hidroxi-
butiril-CoA en 4-hidroxi-
butanal mediante 4-hidroxi-
butiril-CoA reductasa (o 4-hidroxi-
butanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b). Puede convertirse 4-hidroxi-
butanal en 1,4-butanodiol mediante 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a).

TABLA 17. Ruta de BDO a partir de 4-aminobutirato.

Figura	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID de GenBank (si disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
9A	2.8.3.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutirato transferasa	cat1, cat2, cat3	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	<i>Escherichia coli</i>	butanoato
9A	3.1.2.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutiril-CoA hidrolasa	tesb	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>	3-hidroxiopropanoil-CoA
9A	6.2.1.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutirato-CoA ligasa (o 4-aminobutiril-CoA sintetasa)	sucCD	NP_415256.1, AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>	succinato
					phl	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>	6-carboxihexanoato
9A	1.4.1.a	4-aminobutiril-CoA	4-oxobutiril-CoA	4-aminobutiril-CoA oxidorreductasa (desaminación)	lysDH	AB052732	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	lisina
					lysDH	NP_147035.1	<i>Aeropyrum pernix K1</i>	lisina
					ldh	P0A393	<i>Bacillus cereus</i>	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanoato
9A	2.6.1.a	4-aminobutiril-CoA	4-oxobutiril-CoA	4-aminobutiril-CoA transaminasa	gabT	P22256.1	<i>Escherichia coli</i>	4-aminobutirato
					abat	P50554.3	<i>Rattus norvegicus</i>	3-amino-2-metilpropionato
					SkyPYD4	ABF58893.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	beta-alanina
9A	1.1.1.a	4-oxobutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato

8	1.1.1.c	4-hidroxiacetil-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxiacetil-CoA reductasa (formación de alcohol)	adhE2	AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	semialdehído butanol-CoA
					mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>	acil-CoA de cadena larga
8	1.2.1.b	4-hidroxiacetil-CoA	4-hidroxiacetil-CoA reductasa (o 4-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa)	sucD	sucD	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	Succinil-CoA
					sucD	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>	Malonil-CoA
8	1.1.1.a	4-hidroxiacetil-CoA	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	Succinato semialdehído
							DSM 555	

En la figura 9A se muestran enzimas para otra ruta de BDO a modo de ejemplo que convierten 4-aminobutirato en BDO. En la tabla 18 se indican enzimas de una ruta de BDO a modo de ejemplo de este tipo, junto con genes a modo de ejemplo que codifican para estas enzimas.

- 5 En resumen, puede convertirse 4-aminobutirato en 4-aminobutiril-CoA mediante 4-aminobutirato CoA transferasa (EC 2.8.3.a), 4-aminobutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o 4-aminobutirato-CoA ligasa (o 4-aminobutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). Puede convertirse 4-aminobutiril-CoA en 4-aminobutan-1-ol mediante 4-aminobutiril-CoA reductasa (formación de alcohol) (EC 1.1.1.c). Alternativamente, puede convertirse 4-aminobutiril-CoA en 4-aminobutanal mediante 4-aminobutiril-CoA reductasa (o 4-aminobutanal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b), y puede convertirse 4-aminobutanal en 4-aminobutan-1-ol mediante 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a). Puede convertirse 4-aminobutan-1-ol en 4-hidroxibutanal mediante 4-aminobutan-1-ol oxidoreductasa (desaminación) (EC 1.4.1.a) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa (EC 2.6.1.a). Puede convertirse 4-hidroxibutanal en 1,4-butanodiol mediante 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a).
- 10

TABLA 18. Ruta de BDO a partir de 4-aminobutirato.

Figura	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID de GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
9A	2.8.3.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutirato transferasa	cat1, cat2, cat3	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato, 4-hidroxibutirato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	<i>Escherichia coli</i>	butanoato
9A	3.1.2.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutiril-CoA hidrolasa	tesb	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>	3-hidroxiopropanoil-CoA
9A	6.2.1.a	4-aminobutirato	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutirato-CoA ligasa (o 4-aminobutiril-CoA sintetasa)	sucCD	NP_415256.1, AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>	succinato
					phl	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>	6-carboxihexanoato
9A	1.1.1.c	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutan-1-ol	4-aminobutiril-CoA reductasa (formación de alcohol)	adhE2	AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanol-CoA
					mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>	acil-CoA de cadena larga
9A	1.2.1.b	4-aminobutiril-CoA	4-aminobutanal	4-aminobutiril-CoA reductasa (o 4-aminobutanal deshidrogenasa)	sucD	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	Succinil-CoA
					sucD	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>	Malonil-CoA
9A	1.1.1.a	4-aminobutanal	4-aminobutan-1-ol	4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato

9A	1.4.1.a	4-aminobutan-1-ol	4-hidroxibutanal	4-aminobutan-1-ol oxidoreductasa (desaminación)	lysDH	AB052732	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	semialdehído lisina
					lysDH	NP_147035.1	<i>Aeropyrum permix K1</i>	lisina
					ldh	P0A393	<i>Bacillus cereus</i>	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanoato 4-aminobutirato
9A	2.6.1.a	4-aminobutan-1-ol	4-hidroxibutanal	4-aminobutan-1-ol transaminasa	gabT	P22256.1	<i>Escherichia coli</i>	3-amino-2-metilpropionato beta-alanina
					abat	P50554.3	<i>Rattus norvegicus</i>	general
					SkyPYD4	ABF58893.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	>C3
9A	1.1.1.a	4-hidroxibutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Succinato semialdehído
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	
							DSM 555	

La figura 9B representa una ruta de BDO a modo de ejemplo en la que se convierte 4-aminobutirato en BDO. En la tabla 19 se indican enzimas de una ruta de BDO a modo de ejemplo de este tipo, junto con genes a modo de ejemplo que codifican para estas enzimas.

- 5 En resumen, puede convertirse 4-aminobutirato en ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico mediante 4-aminobutirato cinasa (EC 2.7.2.a). Puede convertirse ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico en 4-aminobutanal mediante 4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1.2.1.d). Puede convertirse 4-aminobutanal en 4-aminobutan-1-ol mediante 4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a). Puede convertirse 4-aminobutan-1-ol en 4-hidroxiбутanal mediante 4-aminobutan-1-ol oxidoreductasa (desaminación) (EC 1.4.1.a) o 4-aminobutan-1-ol transaminasa (EC 2.6.1.a). Alternativamente, puede convertirse ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico en ácido [(4-oxobutanoil)oxi]fosfónico mediante ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico oxidoreductasa (desaminación) (EC 1.4.1.a) o ácido [(4-aminobutanoil)oxi]fosfónico transaminasa (EC 2.6.1.a). Puede convertirse ácido [(4-oxobutanoil)oxi]fosfónico en 4-hidroxiбutiril-fosfato mediante 4-hidroxiбutiril-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.a). Puede convertirse 4-hidroxiбutiril-fosfato en 4-hidroxiбутanal mediante 4-hidroxiбutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1.2.1.d). Puede convertirse 4-hidroxiбутanal en 1,4-butanodiol mediante 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a).
- 10
- 15

TABLA 19. Ruta de BDO a partir de 4-aminobutirato.

Figura	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre gen	ID de GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
9B	2.7.2.a	4-aminobutirato	ácido [(4-aminobutanil)oxi]fosfónico	4-aminobutirato cinasa	ackA	NP_416799.1	<i>Escherichia coli</i>	acetato, propionato
					buk1	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butirato
					proB	NP_414777.1	<i>Escherichia coli</i>	glutamato
9B	1.2.1.d	ácido [(4-aminobutanil)oxi]fosfónico	4-aminobutanal	4-aminobutiraldehído deshidrogenasa (fosforilación)	asd	NP_417891.1	<i>Escherichia coli</i>	L-4-aspartil-fosfato
					proA	NP_414778.1	<i>Escherichia coli</i>	L-glutamil-5-fosfato
					gapA	P0A9B2.2	<i>Escherichia coli</i>	Gliceraldehído-3-fosfato
9B	1.1.1.a	4-aminobutanal	4-aminobutan-1-ol	4-aminobutan-1-ol deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	succinato semialdehído
9B	1.4.1.a	4-aminobutan-1-ol	4-hidroxibutanal	4-aminobutan-1-ol oxidorreductasa (desaminación)	lysDH	AB052732	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	lisina
					lysDH	NP_147035.1	<i>Aeropyrum permix K1</i>	lisina
					ldh	P0A393	<i>Bacillus cereus</i>	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanato
9B	2.6.1.a	4-aminobutan-1-ol	4-hidroxibutanal	4-aminobutan-1-ol transaminasa	gabT	P22256.1	<i>Escherichia coli</i>	4-aminobutirato
					abat	P50554.3	<i>Rattus norvegicus</i>	3-amino-2-metilpropionato
					SkyPYD4	ABF58893.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	beta-alanina
9B	1.4.1.a	ácido [(4-aminobutanil)oxi]fosfónico	ácido oxobutanil oxi]fosfónico	ácido aminobutanil oxi]fosfónico oxidorreductasa (desaminación)	lysDH	AB052732	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	lisina
					lysDH	NP_147035.1	<i>Aeropyrum permix K1</i>	lisina
					ldh	P0A393	<i>Bacillus cereus</i>	leucina, isoleucina,

9B	2.6.1.a	ácido [(4-aminobutanil) oxifosfónico	ácido [(4-oxobutanil) oxifosfónico	ácido [(4-aminobutanil) oxifosfónico transaminasa	gabT		P22256.1	<i>Escherichia coli</i>	valina, aminobutanoato 2-4-aminobutirato
					SkyPYD4		ABF58893.1	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	beta-alanina
					serC		NP_415427.1	<i>Escherichia coli</i>	fosfoserina, fosfohidroxitreonina
9B	1.1.1.a	ácido [(4-oxobutanil) oxifosfónico	4-hidroxi butiril-fosfato	4-hidroxi butiril-fosfato deshidrogenasa	ADH2		NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD		NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd		L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	succinato semialdehído
9B	1.2.1.d	4-hidroxi butiril-fosfato	4-hidroxi butanal	4-hidroxi butiraldehído deshidrogenasa (fosforilación)	asd		NP_417891.1	<i>Escherichia coli</i>	L-4-aspartil-fosfato
					proA		NP_414778.1	<i>Escherichia coli</i>	L-glutamil-5-fosfato
					gapA		P0A9B2.2	<i>Escherichia coli</i>	Glicerinaldehído-3-fosfato
9B	1.1.1.a	4-hidroxi butanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	ADH2		NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD		NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd		L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Succinato semialdehído

La figura 9C muestra una a ruta modo de ejemplo a través de acetoacetato.

EJEMPLO VIII

5 Rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de alfa-cetoglutarato

Este ejemplo describe rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de alfa-cetoglutarato.

10 La figura 10 representa rutas de BDO a modo de ejemplo en las que se convierte alfa-cetoglutarato en BDO. En la tabla 20 se indican enzimas de una ruta de BDO a modo de ejemplo de este tipo, junto con genes a modo de ejemplo que codifican para estas enzimas.

15 En resumen, puede convertirse alfa-cetoglutarato en alfa-cetoglutaril-fosfato mediante alfa-cetoglutarato 5-cinasa (EC 2.7.2.a). Puede convertirse alfa-cetoglutaril-fosfato en ácido 2,5-dioxopentanoico mediante semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1.2.1.d). Puede convertirse ácido 2,5-dioxopentanoico en ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico mediante ácido 2,5-dioxopentanoico reductasa (EC 1.1.1.a). Alternativamente, puede convertirse alfa-cetoglutarato en alfa-cetoglutaril-CoA mediante alfa-cetoglutarato CoA transferasa (EC 2.8.3.a), alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o alfa-cetoglutaril-CoA ligasa (o alfa-cetoglutaril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a).
 20 Puede convertirse alfa-cetoglutaril-CoA en ácido 2,5-dioxopentanoico mediante alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (o ácido 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b). Puede convertirse ácido 2,5-dioxopentanoico en ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico mediante ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa. Alternativamente, puede convertirse alfa-cetoglutaril-CoA en ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico mediante alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol) (EC 1.1.1.c). Puede convertirse ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico en 4-hidroxibutanal mediante ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa (EC 4.1.1.a).
 25 Puede convertirse 4-hidroxibutanal en 1,4-butanodiol mediante 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a). Puede convertirse ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico en 4-hidroxibutiril-CoA mediante ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (EC 1.2.1.c).

TABLA 20. Ruta de BDO a partir de alfa-cetoglutarato.

Figura	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID de GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
10	2.7.2.a	alfa-cetoglutarato	alfa-cetoglutarilfosfato	alfa-cetoglutarato 5-cinasa	ackA	NP_416799.1	<i>Escherichia coli</i>	acetato, propionato, butirato
					buk1	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	glutamato
10	1.2.1.d	alfa-cetoglutarilfosfato	ácido 2,5-dioxopentanoico	semialdehído 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa (fosforilación)	proB proA	NP_414777.1 NP_414778.1	<i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli</i>	L-glutamil-5-fosfato
					asd	NP_417891.1	<i>Escherichia coli</i>	L-4-aspartil-fosfato
					gapA	P0A9B2.2	<i>Escherichia coli</i>	Gliceraldehído-3-fosfato
10	1.1.1.a	ácido 2,5-dioxopentanoico	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico	ácido dioxopentanoico reductasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	succinato semialdehído
10	2.8.3.a	alfa-cetoglutarato	alfa-cetoglutaril-CoA	alfa-cetoglutarato CoA transferasa	cat1, cat2, cat3	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato, 4-hidroxi-butarato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	<i>Escherichia coli</i>	butanoato
10	3.1.2.a	alfa-cetoglutarato	alfa-cetoglutaril-CoA	alfa-cetoglutaril-CoA hidrolasa	tesB	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>	3-hidroxi-propanoil-CoA
10	6.2.1.a	alfa-cetoglutarato	alfa-cetoglutaril-CoA	alfa-cetoglutaril-CoA ligasa (o alfa-cetoglutaril-CoA sintetasa)	sucCD	NP_415256.1, AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>	succinato
					phl	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>	6-

10	1.2.1.b	alfa-cetoglutaril-CoA	ácido 2,5-dioxopentanoico	alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (o ácido 2,5-dioxopentanoico deshidrogenasa)	sucD	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	carboxihexanoato Succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>	Malonil-CoA
					bphG	BAA03892.1	<i>Pseudomonas sp</i>	acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído
10	1.1.1.a	ácido 2,5-dioxopentanoico	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD 4hbd	NP_417484.1 L21902.1	<i>Escherichia coli</i> <i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	>C3 succinato semialdehído
10	1.1.1.c	alfa-cetoglutaril-CoA	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico	alfa-cetoglutaril-CoA reductasa (formación de alcohol)	adhE2	AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanoil-CoA
					mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>	acil-CoA de cadena larga
10	4.1.1.a	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico	4-hidroxi-2-butanal	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa	pdC	P06672.1	<i>Zymomonas mobilis</i>	ácido 2-oxopentanoico
					mdlC	P20906.2	<i>Pseudomonas putida</i>	ácido 2-oxopentanoico
					pdcl	P06169	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	piruvato
10	1.1.1.a	4-hidroxi-2-butanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD 4hbd	NP_417484.1 L21902.1	<i>Escherichia coli</i> <i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	>C3 succinato semialdehído
10	1.2.1.c	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico	4-hidroxi-2-butanal	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación)	sucA, sucB, lpd	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	<i>Escherichia coli</i>	Alfa-cetoglutarato
					bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	<i>Bacillus subtilis</i>	derivados 2-cetoácidos de valina, leucina e isoleucina

					Bckdha, Bckdhb, Dld	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	<i>Rattus norvegicus</i>	derivados cetoácidos de valina, leucina e isoleucina
--	--	--	--	--	---------------------------	---	--------------------------	--

EJEMPLO IX

Rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de glutamato

5 Este ejemplo describe rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de glutamato.

La figura 11 representa rutas de BDO a modo de ejemplo en las que se convierte glutamato en BDO. En la tabla 21 se indican enzimas de una ruta de BDO a modo de ejemplo de este tipo, junto con genes a modo de ejemplo que codifican para estas enzimas.

10 En resumen, puede convertirse glutamato en glutamil-CoA mediante glutamato CoA transferasa (EC 2.8.3.a), glutamil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o glutamil-CoA ligasa (o glutamil-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). Alternativamente, puede convertirse glutamato en glutamato-5-fosfato mediante glutamato 5-cinasa (EC 2.7.2.a). Puede convertirse glutamato-5-fosfato en glutamato-5-semialdehído mediante glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación) (EC 1.2.1.d). Puede convertirse glutamil-CoA en glutamato-5-semialdehído mediante glutamil-CoA reductasa (o glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b). Puede convertirse glutamato-5-semialdehído en ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico mediante glutamato-5-semialdehído reductasa (EC 1.1.1.a). Alternativamente, puede convertirse glutamil-CoA en ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico mediante glutamil-CoA reductasa (formación de alcohol) (EC 1.1.1.c). Puede convertirse ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico en ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico mediante ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidorreductasa (desaminación) (EC 1.4.1.a) o ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa (EC 2.6.1.a). Puede convertirse ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico en 4-hidroxibutanol mediante ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa (EC 4.1.1.a). Puede convertirse 4-hidroxibutanol en 1,4-butanodiol mediante 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a). Alternativamente, puede convertirse ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico en 4-hidroxibutiril-CoA mediante ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación) (EC 1.2.1.c).

25

TABLA 21. Ruta de BDO a partir de glutamato.

Figura	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID de GenBank (si disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
11	2.8.3.a	glutamato	glutamil-CoA	glutamato transferasa	cat1, cat2, cat3	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato, 4-hidroxi-butarato, 4-butarato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	<i>Escherichia coli</i>	butanoato
11	3.1.2.a	glutamato	glutamil-CoA	glutamil-CoA hidrolasa	tesb	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>	3-hidroxi-propanoil-CoA
11	6.2.1.a	glutamato	glutamil-CoA	glutamil-CoA ligasa (o glutamil-CoA sintetasa)	sucCD	NP_415256.1, AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>	succinato
					phl	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>	6-carboxi-hexanoato
11	2.7.2.a	glutamato	glutamato-5-fosfato	glutamato 5-cinasa	ack4	NP_416799.1	<i>Escherichia coli</i>	acetato, propionato
					buk1	NP_349675	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butirato
					proB	NP_414777.1	<i>Escherichia coli</i>	glutamato
11	1.2.1.d	glutamato-5-fosfato	glutamato-5-semialdehído	glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (fosforilación)	proA	NP_414778.1	<i>Escherichia coli</i>	L-glutamil-5-fosfato
					asd	NP_417891.1	<i>Escherichia coli</i>	L-4-aspartil-fosfato
					gapA	P0A9B2.2	<i>Escherichia coli</i>	Glicerilaldehído-3-fosfato
11	1.2.1.b	glutamil-CoA	glutamato-5-semialdehído	glutamil-CoA reductasa (o glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa)	sucD	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	Succinil-CoA
					Msed_0709	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>	Malonil-CoA
					bphG	BAA03892.1	<i>Pseudomonas sp</i>	acetilaldehído,

11	1.1.1.a	glutamato-5-semialdehído	2-amino-5-hidroxipentanoico ácido	glutamato-5-semialdehído reductasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	propionaldehído, butiraldehído, isobutiraldehído y formaldehído general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	succinato semialdehído
11	1.1.1.c	glutamyl-CoA	ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico	glutamyl-CoA reductasa (formación de alcohol)	adhE2	AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanol-CoA
					mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>	acil-CoA de cadena larga
11	1.4.1.a	2-amino-5-hidroxipentanoico ácido	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico	ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico oxidoreductasa (desaminación)	gdhA	P00370	<i>Escherichia coli</i>	glutamato
					ldh	P0A393	<i>Bacillus cereus</i>	leucina, isoleucina, valina, 2-aminobutanoato
					nadX	NP_229443.1	<i>Thermotoga maritima</i>	aspartato
11	2.6.1.a	2-amino-5-hidroxipentanoico ácido	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico	ácido 2-amino-5-hidroxipentanoico transaminasa	aspC	NP_415448.1	<i>Escherichia coli</i>	aspartato
					AAT2	P23542.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	aspartato
					avtA	YP_026231.1	<i>Escherichia coli</i>	valina, alfa-aminobutirato
11	4.1.1.a	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico	4-hidroxi-butanal	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico descarboxilasa	pdC	P06672.1	<i>Zymomonas mobilis</i>	ácido oxopentanoico 2-
					mdlC	P20906.2	<i>Pseudomonas putida</i>	ácido oxopentanoico 2-
					pdcl	P06169	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	piruvato
11	1.1.1.a	4-hidroxi-butanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato

11	1.2.1.c	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico	4-hidroxi-2-butil-CoA	ácido 5-hidroxi-2-oxopentanoico deshidrogenasa (descarboxilación)	sucA, sucB, lpd	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	<i>DSM 555</i> <i>Escherichia coli</i>	semialdehído Alfa-cetoglutarato
					bfbBB, bfbBAA, bfbBAB, bfbBAB, pdhD	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	<i>Bacillus subtilis</i>	derivados de 2-cetoácidos de valina, leucina e isoleucina
					Bckdha, Bckdhb, Dld	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	<i>Rattus norvegicus</i>	derivados de 2-cetoácidos de valina, leucina e isoleucina

EJEMPLO X

Rutas de BDO a modo de ejemplo a partir de acetoacetyl-CoA

- 5 Este ejemplo describe una ruta de BDO a modo de ejemplo a partir de acetoacetyl-CoA.

La figura 12 representa rutas de BDO a modo de ejemplo en las que se convierte acetoacetyl-CoA en BDO. En la tabla 22 se indican enzimas de una ruta de BDO a modo de ejemplo de este tipo, junto con genes a modo de ejemplo que codifican para estas enzimas.

- 10 En resumen, puede convertirse acetoacetyl-CoA en 3-hidroxiacetyl-CoA mediante 3-hidroxiacetyl-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.a). Puede convertirse 3-hidroxiacetyl-CoA en crotonoil-CoA mediante 3-hidroxiacetyl-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.a). Puede convertirse crotonoil-CoA en vinilacetyl-CoA mediante vinilacetyl-CoA Δ -isomerasa (EC 5.3.3.3). Puede convertirse vinilacetyl-CoA en 4-hidroxiacetyl-CoA mediante 4-hidroxiacetyl-CoA deshidratasa (EC 4.2.1.a). Puede convertirse 4-hidroxiacetyl-CoA en 1,4-butanodiol mediante 4-hidroxiacetyl-CoA reductasa (formación de alcohol) (EC 1.1.1.c). Alternativamente, puede convertirse 4-hidroxiacetyl-CoA en 4-hidroxiacetal mediante 4-hidroxiacetyl-CoA reductasa (o 4-hidroxiacetal deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b). Puede convertirse 4-hidroxiacetal en 1,4-butanodiol mediante 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a).
- 15

TABLA 22. Ruta de BDO a partir de acetoacetil-CoA.

Figura	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID de GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
12	1.1.1.a	acetoacetil-CoA	3-hidroxiacetyl-CoA	3-hidroxiacetyl-CoA deshidrogenasa	hbd	NP_349314.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	3-hidroxiacetyl-CoA
					hbd	AAM14586.1	<i>Clostridium beijerinckii</i>	3-hidroxiacetyl-CoA
					Msed_1423	YP_001191505	<i>Metallosphaera sedula</i>	3-hidroxiacetyl-CoA supuesto
12	4.2.1.a	3-hidroxiacetyl-CoA	crotonoil-CoA	3-hidroxiacetyl-CoA deshidratasa	crt	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	3-hidroxiacetyl-CoA
					maoC	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>	3-hidroxiacetyl-CoA
					paaf	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>	3-hidroxiacetyl-CoA
12	5.3.3.3	crotonoil-CoA	vinilacetyl-CoA	vinilacetyl-CoA Δ -isomerasa	abfD	YP_001396399.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	4-hidroxiacetyl-CoA
					abfD	P55792	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	4-hidroxiacetyl-CoA
					abfD	YP_001928843	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	4-hidroxiacetyl-CoA
12	4.2.1.a	vinilacetyl-CoA	4-hidroxiacetyl-CoA	4-hidroxiacetyl-CoA deshidratasa	abfD	YP_001396399.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	4-hidroxiacetyl-CoA
					abfD	P55792	<i>Clostridium aminobutyricum</i>	4-hidroxiacetyl-CoA
					abfD	YP_001928843	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	4-hidroxiacetyl-CoA
12	1.1.1.c	4-hidroxiacetyl-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxiacetyl-CoA reductasa (formación de alcohol)	adhE2	AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanol-CoA
					mcr	AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	malonil-CoA
					FAR	AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>	acil-CoA de cadena larga
12	1.2.1.b	4-hidroxiacetyl-CoA	4-hidroxiacetal	4-hidroxiacetyl-CoA reductasa (o 4-hidroxiacetal deshidrogenasa)	sucD	P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	Succinil-CoA
					sucD	NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Succinil-CoA

					Msed_0709	YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>	Malonil-CoA
12	1.1.1.a	4-hidroxiibutanal	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa	ADH2	NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general
					yqhD	NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3
					4hbd	L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Succinato semialdehido

EJEMPLO XI

Ruta de BDO a modo de ejemplo a partir de homoserina

- 5 Este ejemplo describe una ruta de BDO a modo de ejemplo a partir de homoserina.

La figura 13 representa rutas de BDO a modo de ejemplo en las que se convierte homoserina en BDO. En la tabla 23 se indican enzimas de una ruta de BDO a modo de ejemplo de este tipo, junto con genes a modo de ejemplo que codifican para estas enzimas.

- 10 En resumen, puede convertirse homoserina en 4-hidroxibut-2-enoato mediante homoserina desaminasa (EC 4.3.1.a). Alternativamente, puede convertirse homoserina en homoserina-CoA mediante homoserina CoA transferasa (EC 2.8.3.a), homoserina-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) u homoserina-CoA ligasa (o homoserina-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). Puede convertirse homoserina-CoA en 4-hidroxibut-2-enoil-CoA mediante homoserina-CoA desaminasa (EC 4.3.1.a). Puede convertirse 4-hidroxibut-2-enoato en 4-hidroxibut-2-enoil-CoA mediante 4-hidroxibut-2-enoil-CoA transferasa (EC 2.8.3.a), 4-hidroxibut-2-enoil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a), o 4-hidroxibut-2-enoil-CoA ligasa (o 4-hidroxibut-2-enoil-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). Alternativamente, puede convertirse 4-hidroxibut-2-enoato en 4-hidroxibutirato mediante 4-hidroxibut-2-enoato reductasa (EC 1.3.1.a). Puede convertirse 4-hidroxibutirato en 4-hidroxibutiril-CoA mediante 4-hidroxibutiril-CoA transferasa (EC 2.8.3.a), 4-hidroxibutiril-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.a) o 4-hidroxibutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxibutiril-CoA sintetasa) (EC 6.2.1.a). Puede convertirse 4-hidroxibut-2-enoil-CoA en 4-hidroxibutiril-CoA mediante 4-hidroxibut-2-enoil-CoA reductasa (EC 1.3.1.a). Puede convertirse 4-hidroxibutiril-CoA en 1,4-butanodiol mediante 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol) (EC 1.1.1.c). Alternativamente, puede convertirse 4-hidroxibutiril-CoA en 4-hidroxibutanol mediante 4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanol deshidrogenasa) (EC 1.2.1.b). Puede convertirse 4-hidroxibutanol en 1,4-butanodiol mediante 1,4-butanodiol deshidrogenasa (EC 1.1.1.a).
- 15
- 20
- 25

TABLA 23. Ruta de BDO a partir de homoserina.

Figura	Clase de EC	Sustrato deseado	Producto deseado	Nombre de enzima	Nombre de gen	ID de GenBank (si está disponible)	Organismo	Sustratos conocidos
13	4.3.1.a	homoserina	4-hidroxi-2-enoato	homoserina desaminasa	aspA	NP_418562	<i>Escherichia coli</i>	aspartato
					aspA	P44324.1	<i>Haemophilus influenzae</i>	aspartato
					aspA	P07346	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	aspartato
13	2.8.3.a	homoserina	homoserina-CoA	homoserina transferasa	cat1, cat2, cat3	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato, 4-hidroxi-2-enoato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	<i>Escherichia coli</i>	butanoato
13	3.1.2.a	homoserina	homoserina-CoA	homoserina-CoA hidrolasa	tesb	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>	3-hidroxi-2-enoato-CoA
13	6.2.1.a	homoserina	homoserina-CoA	homoserina-CoA ligasa (o homoserina-CoA sintetasa)	sucCD	NP_415256.1, AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>	succinato
					phl	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>	6-carboxihexanoato
13	4.3.1.a	homoserina-CoA	4-hidroxi-2-enoil-CoA	homoserina-CoA desaminasa	ac11	CAG29274.1	<i>Clostridium propionicum</i>	beta-alanil-CoA
					ac12	CAG29275.1	<i>Clostridium propionicum</i>	beta-alanil-CoA
					MIXAN_438 5	YP_632558.1	<i>Myxococcus xanthus</i>	beta-alanil-CoA
13	2.8.3.a	4-hidroxi-2-enoato	4-hidroxi-2-enoil-CoA	4-hidroxi-2-enoil-CoA transferasa	cat1, cat2, cat3	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato, 4-hidroxi-2-enoato, butirato
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	<i>Escherichia coli</i>	butanoato

13	3.1.2.a	4-hidroxiibut-2-enoato	4-hidroxiibut-2-enoil-CoA	4-hidroxiibut-2-enoil-CoA hidrolasa	tesb	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>	3-hidroxiopropanoil-CoA
13	6.2.1.a	4-hidroxiibut-2-enoato	4-hidroxiibut-2-enoil-CoA	4-hidroxiibut-2-enoil-CoA ligasa (o 4-hidroxiibut-2-enoil-CoA sintetasa)	sucCD	NP_415256.1, AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>	succinato
					phl	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>	6-carboxihexanoato
13	1.3.1.a	4-hidroxiibut-2-enoato	4-hidroxiibutirato	4-hidroxiibut-2-enoato reductasa	enr	CAA71086.1	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	
					enr	CAA76083.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	
					enr	YP_430895.1	<i>Moorella thermoacetica</i>	
13	2.8.3.a	4-hidroxiibutirato	4-hidroxiibutiril-CoA	4-hidroxiibutiril-CoA transferasa	cat1, cat2, cat3	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	succinato, 4-hidroxiibutirato, butirato
					gclA, gclB	CAA57199.1, CAA57200.1	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	glutarato
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	<i>Escherichia coli</i>	butanoato
13	3.1.2.a	4-hidroxiibutirato	4-hidroxiibutiril-CoA	4-hidroxiibutiril-CoA hidrolasa	tesB	NP_414986	<i>Escherichia coli</i>	adipil-CoA
					acot12	NP_570103.1	<i>Rattus norvegicus</i>	butiril-CoA
					hibch	Q6NVY1.2	<i>Homo sapiens</i>	3-hidroxiopropanoil-CoA
13	6.2.1.a	4-hidroxiibutirato	4-hidroxiibutiril-CoA	4-hidroxiibutiril-CoA ligasa (o 4-hidroxiibutiril-CoA sintetasa)	sucCD	NP_415256.1, AAC73823.1	<i>Escherichia coli</i>	succinato
					phl	CAJ15517.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	fenilacetato
					bioW	NP_390902.2	<i>Bacillus subtilis</i>	6-carboxihexanoato
13	1.3.1.a	4-hidroxiibut-2-enoil-CoA	4-hidroxiibutiril-CoA	4-hidroxiibut-2-enoil-CoA reductasa	bcd, etfA, etfB	NP_349317.1, NP_349315.1, NP_349316.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	

						TER		Q5EU90.1	<i>Euglena gracilis</i>		
						TDE0597		NP_971211.1	<i>Treponema denticola</i>		
8	1.1.1.c	4-hidroxibutiril-CoA	1,4-butanodiol	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (formación de alcohol)		adhE2		AAK09379.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	butanol-CoA	
						mcr		AAS20429.1	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	malonil-CoA	
						FAR		AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>	acil-CoA de cadena larga	
8	1.2.1.b	4-hidroxibutiril-CoA	4-hidroxibutanol	4-hidroxibutiril-CoA reductasa (o 4-hidroxibutanol deshidrogenasa)		sucD		P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>	Succinil-CoA	
						sucD		NP_904963.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Succinil-CoA	
						Msed_0709		YP_001190808.1	<i>Metallosphaera sedula</i>	Malonil-CoA	
8	1.1.1.a	4-hidroxibutanol	1,4-butanodiol	1,4-butanodiol deshidrogenasa		ADH2		NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	general	
						yqhD		NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>	>C3	
						4hbd		L21902.1	<i>Clostridium kluyveri</i> DSM 555	Succinato semialdehído	

EJEMPLO XII

Cepas productoras de BDO que expresan succinil-CoA sintetasa

- 5 Este ejemplo describe la producción aumentada de BDO en cepas productoras de BDO que expresan succinil-CoA sintetasa.

10 Tal como se comentó anteriormente, el succinato puede ser un precursor para la producción de BDO mediante conversión en succinil-CoA (véanse también los documentos WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación estadounidense 2009/0047719, publicación estadounidense 2009/0075351). Por tanto, se modificó genéticamente la cepa huésped para sobreexpresar los genes *sucCD* de *E. coli*, que codifican para succinil-CoA sintetasa. En la figura 14A se muestra la secuencia de nucleótidos del operón *sucCD* de *E. coli*, y en las figuras 14B y 14C se muestran las secuencias de aminoácidos para las subunidades de succinil-CoA sintetasa codificadas. En resumen, se clonaron los genes *sucCD* de *E. coli* mediante PCR a partir de ADN cromosómico de *E. coli* y se introdujeron en plásmidos de múltiples copias pZS*13, pZA13 y pZE33 tras el promotor PA1lacO-1 (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997)) usando procedimientos de biología molecular convencionales.

20 Se sobreexpresaron los genes *sucCD* de *E. coli*, que codifican para la succinil-CoA sintetasa. Los resultados mostraron que la introducción en las cepas de *sucCD* para expresar succinil-CoA sintetasa mejoró la producción de BDO en diversas cepas en comparación o bien con niveles nativos de expresión o bien con la expresión de *cat1*, que es una succinil-CoA/acetil-CoA transferasa. Por tanto, la producción de BDO se mejoró mediante sobreexpresión de los genes *sucCD* de *E. coli* nativos que codifican para succinil-CoA sintetasa.

EJEMPLO XIII

25 Expresión de genes heterólogos que codifican para enzimas de la ruta de BDO

Este ejemplo describe la expresión de diversas enzimas de la ruta no nativas para proporcionar una producción mejorada de BDO.

30 Alfa-cetoglutarato descarboxilasa. Se expresó el gen *sucA* de *Mycobacterium bovis* que codifica para alfa-cetoglutarato descarboxilasa en cepas huésped. La sobreexpresión de *sucA* de *M. bovis* mejoró la producción de BDO (véanse también los documentos WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación estadounidense 2009/0047719, publicación estadounidense 2009/0075351). En la figura 15 se muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de *sucA* de *M. bovis* y la alfa-cetoglutarato descarboxilasa codificada.

35 Para construir las cepas que expresan *sucA* de *M. bovis*, se amplificaron fragmentos del gen *sucA* que codifica para la alfa-cetoglutarato descarboxilasa a partir del ADN genómico de *Mycobacterium bovis* BCG (ATCC 19015; Colección americana de cultivos tipo, Manassas VA) usando los cebadores mostrados a continuación. Se ensambló el gen de longitud completa mediante reacción de ligación de los cuatro fragmentos de ADN amplificados, y se clonó en vectores de expresión pZS*13 y pZE23 tras el promotor P_{A1lacO-1} (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997)). Se verificó la secuencia de nucleótidos del gen ensamblado mediante secuenciación de ADN.

Cebadores para el fragmento 1:

45 5'-ATGTACCGCAAGTTCCGC-3' (SEQ ID NO:)

5'-CAATTTGCCGATGCCCAG-3' (SEQ ID NO:)

50 Cebadores para el fragmento 2:

5'-GCTGACCACTGAAGACTTTG-3' (SEQ ID NO:)

55 5'-GATCAGGGCTTCGGTGTAG-3' (SEQ ID NO:)

Cebadores para el fragmento 3:

5'-TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTC-3' (SEQ ID NO:)

60 5'-TCAGCCGAACGCCTCGTCGAGGATCTCCTG-3' (SEQ ID NO:)

Cebadores para el fragmento 4:

5'-TGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAAC-3' (SEQ ID NO:)

65 5'-TCTCTTCAACCAGCCATTCGTTTTGCCCG-3' (SEQ ID NO:)

Se demostró la expresión funcional de la alfa-cetoglutarato descarboxilasa usando ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se midió la actividad enzimática SucA siguiendo un método anteriormente notificado (Tian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:10670-10675 (2005)). La mezcla de reacción contenía tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0, pirofosfato de tiamina 0,2 mM, MgCl₂ 1 mM, ferricianuro 0,8 mM, alfa-cetoglutarato 1 mM y lisado en bruto de células. Se monitorizó la actividad enzimática mediante la reducción de ferricianuro a 430 nm. Se verificó la función *in vivo* de la enzima SucA usando cultivo de células completas de *E. coli*. Se inocularon colonias individuales de *E. coli* MG1655 lacI^q transformado con plásmidos que codificaban para la enzima SucA y la 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (4Hbd) en 5 ml de medio LB que contenía antibióticos apropiados. Se cultivaron las células a 37°C durante la noche de manera aerobia. Se introdujeron 200 µl de este cultivo durante la noche en 8 ml de medio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 6,78 g/l, KH₂PO₄ 3,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1,0 g/l, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM) suplementado con glucosa 20 g/l, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 100 mM para mejorar la capacidad tamponante, tiamina 10 µg/ml, y los antibióticos apropiados. Se establecieron condiciones microaerobias purgando inicialmente botellas anaerobias tapadas con nitrógeno durante 5 minutos, después perforando el septo con una aguja de 23G tras la inoculación. Se mantuvo la aguja en la botella durante el crecimiento para permitir que una pequeña cantidad de aire entrara en las botellas. Se indujo la expresión de proteínas con β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) 0,2 mM cuando el cultivo alcanzó la mitad de la fase de crecimiento logarítmico. Como controles, se cultivaron cepas *E. coli* MG1655 lacI^q transformadas sólo con el plásmido que codificaba para la 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y sólo los vectores vacíos en las mismas condiciones (véase la tabla 23). Se monitorizó la acumulación de 4-hidroxibutirato (4HB) en el medio de cultivo usando un método de CL-EM. Sólo la cepa de *E. coli* que expresaba la alfa-cetoglutarato descarboxilasa de *Mycobacterium* produjo una cantidad significativa de 4HB (véase la figura 16).

Tabla 24. Tres cepas que contienen diversos controles de plásmido y que codifican para sucA y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa.

	Huésped	pZE13	pZA33
1	MG1655 lacI ^q	vector	vector
2	MG1655 lacI ^q	vector	4hbd
3	MG1655 lacI ^q	sucA	4hbd

Un experimento independiente demostró que la ruta de alfa-cetoglutarato descarboxilasa funciona independientemente del ciclo de TCA reductor. Se usó la cepa de *E. coli* ECKh-401 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA) como cepa huésped (véase la tabla 25). Los tres constructos contenían el gen que codificaba para 4HB deshidrogenasa (4Hbd). El constructo 1 también contenía el gen que codificaba para la alfa-cetoglutarato descarboxilasa (sucA). El constructo 2 contenía los genes que codificaban para la succinil-CoA sintetasa (sucCD) y la succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA (sucD), que se requieren para la síntesis de 4HB a través del ciclo de TCA reductor. El constructo 3 contiene todos los genes de 1 y 2. Se cultivaron las tres cepas de *E. coli* en las mismas condiciones tal como se describió anteriormente, excepto porque el segundo cultivo era en condiciones microaerobias. Al expresar la enzima SucA, el constructo 3 produjo más 4HB que el constructo 2, que se basa en el ciclo de TCA reductor para la síntesis de 4HB (véase la figura 17).

Se proporcionó soporte adicional para la contribución de alfa-cetoglutarato descarboxilasa a la producción de 4HB y BDO mediante experimentos de análisis de flujo. Se hicieron crecer cultivos de ECKh-432, que contiene tanto sucCD-sucD como sucA en el cromosoma, en medio mínimo M9 que contenía una mezcla de 1-¹³C-glucosa (60%) y U-¹³C-glucosa (40%). Se recogió la biomasa, se aisló la proteína y se hidrolizó para dar aminoácidos, y se analizó la distribución de marcador de los aminoácidos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) tal como se describió anteriormente (Fischer y Sauer, Eur. J. Biochem. 270:880-891 (2003)). Además, se analizó la distribución de marcador de 4HB y BDO secretados mediante CG-EM tal como se describe en el documento WO2008115840 A2. Se usaron estos datos para calcular la distribución de flujo intracelular usando métodos establecidos (Suthers *et al.*, Metab. Eng. 9:387-405 (2007)). Los resultados indicaron que entre el 56% y el 84% del alfa-cetoglutarato se canalizaba a través de alfa-cetoglutarato descarboxilasa a la ruta de BDO. El resto se oxidaba mediante alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, lo que entonces entraba en BDO a través de la ruta de succinil-CoA.

Estos resultados demuestran cepas productoras de 4-hidroxibutirato que contienen el gen sucA de *Mycobacterium bovis* BCG expresado en un plásmido. Cuando el plásmido que codifica para este gen no está presente, la producción de 4-hidroxibutirato es despreciable cuando no se expresa sucD (succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA). El gen de *M. bovis* es un homólogo estrecho del gen de *Mycobacterium tuberculosis* cuyo producto enzimático se ha caracterizado anteriormente (Tian *et al.*, citado anteriormente, 2005).

Succinato semialdehído deshidrogenasa (dependiente de CoA), 4-hidroxibutirato deshidrogenasa y 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa. Los genes de *Porphyromonas gingivalis* W83 pueden ser componentes eficaces de la ruta para la producción de 1,4-butanodiol (véanse también los documentos WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación estadounidense 2009/0047719, publicación estadounidense 2009/0075351). En la figura 18A se muestra la secuencia de nucleótidos de succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA (sucD) de

Porphyromonas gingivalis, y en la figura 18B se muestra la secuencia de aminoácidos codificada. En la figura 19A se muestra la secuencia de nucleótidos de 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (4hbd) de *Porphyromonas gingivalis*, y en la figura 19B se muestra la secuencia de aminoácidos codificada. En la figura 20A se muestra la secuencia de nucleótidos de 4-hidroxibutirato CoA transferasa (cat2) de *Porphyromonas gingivalis*, y en la figura 20B se muestra la secuencia de aminoácidos codificada.

En resumen, los genes de *Porphyromonas gingivalis* W83 que codifican para succinato semialdehído deshidrogenasa (dependiente de CoA) y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa, y en algunos casos adicionalmente 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA, se clonaron mediante PCR a partir de ADN cromosómico de *P. gingivalis* y se introdujeron en plásmidos de múltiples copias pZS*13, pZA13, y pZE33 tras el promotor PA1lacO-1 (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997)) usando procedimientos de biología molecular convencionales. Después se introdujeron estos plásmidos en cepas huésped.

Se introdujeron los genes de *Porphyromonas gingivalis* W83 en cepas de producción tal como se describió anteriormente. Algunas cepas sólo incluyeron succinato semialdehído deshidrogenasa (dependiente de CoA) y 4-hidroxibutirato deshidrogenasa sin 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa.

Butirato cinasa y fosfotransbutirilasa. Pueden usarse enzimas butirato cinasa (BK) y fosfotransbutirilasa (PTB) para producir 4-hidroxibutiril-CoA (véanse también los documentos WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación estadounidense 2009/0047719, publicación estadounidense 2009/0075351). En particular, pueden usarse los genes de *Clostridium acetobutylicum*, buk1 y ptb, como parte de una ruta de BDO funcional.

Los experimentos iniciales implicaron la clonación y expresión de los genes PTB (020) y BK (021) de *C. acetobutylicum* nativos en *E. coli*. Cuando se requirió, se modificaron el codón de iniciación y el codón de terminación para cada gen a "ATG" y "TAA", respectivamente, para una expresión más óptima en *E. coli*. En las figuras 21 y 22 se muestran las secuencias génicas de *C. acetobutylicum* (020N y 021N) y sus correspondientes secuencias peptídicas traducidas.

Los genes PTB y BK existen en *C. acetobutylicum* como un operón, expresándose en primer lugar el gen PTB (020). Los dos genes están conectados mediante la secuencia "atta aagtaagt gaggaatgtt aac" (SEQ ID NO:) que incluye un sitio de unión al ribosoma de reinicio para el gen BK (021) posterior. En este contexto, se fusionaron los dos genes a promotores controlados por lac en vectores de expresión para su expresión en *E. coli* (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997)).

Se encontró que la expresión de las dos proteínas a partir de estos constructos de vectores era baja en comparación con otros genes expresados de manera exógena debido a la alta incidencia de codones en los genes de *C. acetobutylicum* que se sólo se producen con poca frecuencia en *E. coli*. Por tanto, se predijeron nuevos genes 020 y 021 que cambiaban codones poco frecuentes por alternativas que están más altamente representadas en secuencias génicas de *E. coli*. Este método de optimización de codones siguió algoritmos anteriormente descritos (Sivaraman *et al.*, Nucleic Acids Res. 36:e16(2008)). Este método predice sustituciones de codones en contexto con su frecuencia de aparición cuando están flanqueados por determinados codones a cada lado. Se determinaron secuencias génicas alternativas para 020 (figura 23) y 021 (figura 24) en las que se sustituyeron números crecientes de codones poco frecuentes por codones más prevalentes (A<B<C<D) basándose en su incidencia en el contexto de codones circundantes. No se introdujeron cambios en estas secuencias predichas en la secuencia peptídica real en comparación con las secuencias peptídicas 020 y 021 nativas.

En la figura 25A se muestra la mejora en la expresión de las proteínas BK y PTB resultante de la optimización de codones. La expresión de las secuencias génicas nativas se muestra en el carril 2, mientras que la expresión de 020B-021B y 020C-021C se muestra en los carriles 3 y 4, respectivamente. Niveles superiores de expresión de proteína en los operones con codones optimizados 020B-021B (2021B) y 020C-021C (2021C) también dieron como resultado una actividad aumentada en comparación con el operón nativo (2021n) en extractos en bruto de *E. coli* expresados de manera equivalente (figura 25B).

Se expresaron los operones con codones optimizados en un plásmido en la cepa ECKh-432 ($\Delta adhE \Delta dhA \Delta pfIB \Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA gltAR163L fimD::sucCD$ de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis* fimD::sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*) junto con la aldehído deshidrogenasa de *C. acetobutylicum* para proporcionar una ruta de BDO completa. Se cultivaron células en medio mínimo M9 que contenía glucosa 20 g/l, usando una aguja de 23G para mantener condiciones microaerobias tal como se describió anteriormente. Se midió la conversión resultante de glucosa en el producto final BDO. También se midió la acumulación de gamma-butilactona (GBL), que es una molécula con transposición espontánea derivada de 4Hb-CoA, el producto inmediato del par de enzimas PTB-BK. La figura 26 muestra que la expresión del operón 2021n nativo dio como resultado niveles de BDO comparables a una función enzimática alternativa, Cat2 (034), que es capaz de convertir 4HB y CoA libre en 4HB-CoA. Los niveles de GBL de 034 fueron significativamente superiores a los de 2021n, sugiriendo que la primera enzima tiene más actividad que PTB-BK expresado a partir de los genes nativos. Sin embargo, los niveles tanto de BDO como de GBL fueron superiores a los de cualquiera de 034 ó 2021n cuando se expresaron las variantes con codones optimizados 2021B y 2021C, indicando que la optimización de codones de los genes para

PTB y BK aumenta significativamente sus contribuciones a la síntesis de BDO en *E. coli*.

Estos resultados demuestran que las enzimas butirato cinasa (BK) y fosfotransbutirilasa (PTB) pueden emplearse para convertir 4-hidroxibutirato en 4-hidroxibutiril-CoA. Esto elimina la necesidad de una enzima transferasa tal como 4-hidroxibutiril-CoA/Acetil-CoA transferasa, que generará un mol de acetato por mol de 4-hidroxibutiril-CoA producido. Las enzimas de *Clostridium acetobutylicum* están presentes en varias cepas diseñadas por ingeniería para la producción de BDO.

4-hidroxibutiril-CoA reductasa. El gen ald de *Clostridium beijerinckii* puede usarse como parte de una ruta de BDO funcional (véanse también los documentos WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación estadounidense 2009/0047719, publicación estadounidense 2009/0075351). El gen ald de *Clostridium beijerinckii* también puede usarse para reducir la producción de etanol en cepas productoras de BDO. Adicionalmente, se encontró que una variante de ald con codones optimizados específica (GNM0025B) mejoraba la producción de BDO.

En la figura 27 se muestran el gen ald de *C. beijerinckii* nativo (025n) y la secuencia de proteína predicha de la enzima. Al igual que se observó para los genes PTB y BK de *Clostridium acetobutylicum*, la expresión del gen ald de *C. beijerinckii* nativo era muy baja en *E. coli*. Por tanto, se predijeron cuatro variantes con codones optimizados para este gen. Las figuras 28A-28D muestran secuencias génicas alternativas para 025, en las que números crecientes de codones poco frecuentes se sustituyen por codones más prevalentes (A<B<C<D) basándose en su incidencia en el contexto de codones circundantes (25A, P=0,05; 25B, P=0,1; 25C, P=0,15; 25D, P=1). En estas predicciones no se introdujeron cambios en la secuencia peptídica real en comparación con la secuencia peptídica de 025 nativa. La optimización de codones aumentó significativamente la expresión de ald de *C. beijerinckii* (véase la figura 29), lo que dio como resultado una conversión significativamente superior de glucosa en BDO en células que expresaban la ruta de BDO completa (figura 30A).

Se expresaron los genes nativos y con codones optimizados en un plásmido junto con Cat2 de *P. gingivalis*, en la cepa huésped ECKh-432 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \Delta gltAR163L \Delta ackA \Delta fimD::sucCD$ de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis* fimD::sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*), que contenía por tanto una ruta de BDO completa. Se cultivaron células de manera microaerobia en medio mínimo M9 que contenía glucosa 20 g/l tal como se describió anteriormente. Se comparó la producción relativa de BDO y etanol mediante la enzima Ald de *C. beijerinckii* (expresada a partir del gen variante con codones optimizados 025B) con la enzima AdhE2 de *C. acetobutylicum* (véase la figura 30B). La enzima AdhE2 de *C. acetobutylicum* (002C) produjo casi 4 veces más etanol que BDO. En comparación, Ald de *C. beijerinckii* (025B) (junto con una actividad ADH endógena) produjo cantidades equivalentes de BDO, pero la razón de producción de BDO con respecto a la de etanol se invirtió para esta enzima en comparación con 002C. Esto sugiere que Ald de *C. beijerinckii* es más específica para 4HB-CoA con respecto a acetil-CoA que AdhE2 de *C. acetobutylicum*, y por tanto la primera es la enzima preferida para su inclusión en la ruta de BDO.

Se sometió a prueba el gen ald de *Clostridium beijerinckii* (Toth *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980 (1999)) como candidato para catalizar la conversión de 4-hidroxibutiril-CoA en 4-hidroxibutanal. Se examinaron más de cincuenta aldehído deshidrogenasas para determinar su capacidad para catalizar la conversión de 4-hidroxibutiril-CoA en 4-hidroxibutiraldehído. Se eligió el gen ald de *C. beijerinckii* para su implementación en cepas productoras de BDO debido a la preferencia de esta enzima por 4-hidroxibutiril-CoA como sustrato en contraposición a acetil-CoA. Esto es importante porque la mayoría de las otras enzimas con funcionalidad aldehído deshidrogenasa (por ejemplo, adhE2 de *C. acetobutylicum* (Fontaine *et al.*, J. Bacteriol. 184:821-830 (2002)) convierten preferiblemente acetil-CoA en acetaldehído, lo que a su vez se convierte en etanol. La utilización del gen de *C. beijerinckii* reduce la cantidad de etanol producido como subproducto en organismos productores de BDO. Además, una versión con codones optimizados de este gen se expresa muy bien en *E. coli* (Sivaraman *et al.*, Nucleic Acids Res. 36:e16 (2008)).

4-hidroxibutanal reductasa. Se usó actividad 4-hidroxibutanal reductasa de adh1 de *Geobacillus thermoglucosidasius* (M10EXG). Esto condujo a producción de BDO mejorada aumentando la actividad 4-hidroxibutanal reductasa con respecto a los niveles endógenos.

Se examinaron múltiples alcohol deshidrogenasas para determinar su capacidad para catalizar la reducción de 4-hidroxibutanal para dar BDO. La mayoría de las alcohol deshidrogenasas con alta actividad sobre butiraldehído mostraron una actividad mucho menor sobre 4-hidroxibutiraldehído. Una excepción notable es el gen adh1 de *Geobacillus thermoglucosidasius* M10EXG (Jeon *et al.*, J. Biotechnol. 135:127-133 (2008)) (GNM0084), que muestra alta actividad tanto sobre 4-hidroxibutanal como sobre butanal.

En la figura 31 se muestran la secuencia génica nativa y la secuencia de proteína codificada si el gen adh1 de *Geobacillus thermoglucosidasius*. Se expresó el gen ald1 de *G. thermoglucosidasius* en *E. coli*.

La enzima Adh1 (084) se expresó muy bien a partir de su gen nativo en *E. coli* (véase la figura 32A). En ensayos de enzima ADH, la enzima expresada en *E. coli* mostró una actividad reductora muy alta cuando se usaron butiraldehído o 4HB-aldehído como sustratos (véase la figura 32B). Los valores de K_m determinados para estos

sustratos fueron de 1,2 mM y 4,0 mM, respectivamente. Estos valores de actividad mostraron que la enzima Adh1 era la más activa sobre la reducción de 4HB-aldehído de todos los candidatos sometidos a prueba.

Se sometió a prueba la enzima 084 para determinar su capacidad para reforzar la producción de BDO cuando se acopla con ald de *C. beijerinckii*. Se insertó el gen 084 detrás del gen 025B variante de ald de *C. beijerinckii* para crear un operón sintético que da como resultado la expresión acoplada de ambos genes. Constructos similares vincularon 025B con otros genes candidatos de ADH, y se sometió a prueba el efecto de incluir cada ADH con 025B sobre la producción de BDO. La cepa huésped usada fue ECKh-459 ($\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::fmr-pflB6$ -K.p.lpdA322 Δmdh $\Delta arcA$ $\Delta gltAR163L$ $\Delta fimD::sucCD$ de *E. coli*, $\Delta sucD$ de *P. gingivalis*, $\Delta 4hbd$ de *P. gingivalis* $\Delta fimD::sucA$ de *M. bovis*, $\Delta 4hbd$ de *C. kluyveri* $\Delta fimD::buk1$ de *C. acetobutylicum*, Δptb de *C. acetobutylicum*), que contiene el resto de la ruta de BDO en el cromosoma. El ADH 084 expresado junto con 025B mostró la mayor cantidad de BDO (flecha derecha en la figura 33) en comparación con sólo 025B (flecha izquierda en la figura 33) y junto con funciones ADH endógenas. También produjo más BDO que otras enzimas ADH cuando se emparejó con 025B, indicado de la siguiente manera: 026A-C, variantes con codones optimizados de butanol deshidrogenasa de *Clostridium acetobutylicum*; 050, alcohol deshidrogenasa I de *Zymomonas mobilis*; 052, 1,3-propanodiol deshidrogenasa de *Citrobacter freundii*; 053, 1,3-propanodiol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis*; 057, lactaldehído reductasa de *Bacteroides fragilis*; 058, 1,3-propanodiol deshidrogenasa de *E. coli*; 071, alfa-cetoglutarato semialdehído deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* 168. Los constructos marcados "PT5lacO" son aquellos en los que los genes se impulsan por el promotor PT5lacO. En todos los demás casos, se usó el promotor PA1lacO-1. Esto muestra que la inclusión de ADH 084 en la ruta de BDO aumentó la producción de BDO.

EJEMPLO XIV

Cepas productoras de BDO que expresan piruvato deshidrogenasa

Este ejemplo describe la utilización de piruvato deshidrogenasa (PDH) para potenciar la producción de BDO. Se usó la expresión heteróloga del gen *lpdA* de *Klebsiella pneumonia* para potenciar la producción de BDO.

Computacionalmente, se requiere la conversión generadora de NADH de piruvato en acetil-CoA para alcanzar el rendimiento teórico máximo de 1,4-butanodiol (véanse también los documentos WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación estadounidense 2009/0047719, publicación estadounidense 2009/0075351; WO 2008/018930; Kim *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Kim *et al.*, J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008); Menzel *et al.*, J. Biotechnol. 56:135-142 (1997)). Se mostró que la falta de actividad PDH reduce el rendimiento teórico máximo anaerobio de BDO en un 11% si no puede alcanzarse actividad fosfoenolpiruvato carboxicina (PEPCK) y en un 3% si puede alcanzarse actividad PEPCK. Sin embargo, de manera más importante, la ausencia de actividad PDH en la cepa de OptKnock n.º 439, descrita en el documento WO 2009/023493 y la publicación estadounidense 2009/0047719, que era la versión desactivada de ADHER, ASPT, LDH_D, MDH y PFLI, reducirá el rendimiento aerobio máximo de BDO en un 54% o un 43% si la actividad PEPCK está ausente o presente, respectivamente. En presencia de un aceptor de electrones externo, la falta de actividad PDH reducirá el rendimiento máximo de la cepa desactivada en un 10% o un 3% suponiendo que la actividad PEPCK está ausente o presente, respectivamente.

PDH es una de las enzimas más complicadas del metabolismo central y está compuesta por 24 copias de piruvato descarboxilasa (E1) y 12 moléculas de dihidrolipoilo deshidrogenasa (E3), que se unen al exterior del núcleo de dihidrolipoilo transacetilasa (E2). PDH se inhibe mediante razones altas de NADH/NAD, ATP/ADP y acetil-CoA/CoA. La enzima muestra de manera natural muy baja actividad en condiciones con oxígeno limitado o anaerobias en organismos tales como *E. coli* debido en gran parte a la sensibilidad a NADH de E3, codificada por *lpdA*. Para ello, se clonó una versión insensible a NADHI del gen *lpdA* de *Klebsiella pneumonia* y se expresó para aumentar la actividad de PDH en condiciones en las que se espera que la razón NADH/NAD sea alta.

Sustitución de *lpdA* nativo. El operón de piruvato deshidrogenasa de *Klebsiella pneumoniae* es idéntico en entre el 78 y el 95% a nivel de nucleótidos al operón equivalente de *E. coli*. Anteriormente se mostró que *K. pneumoniae* tiene la capacidad para crecer de manera anaerobia en presencia de glicerol (Menzel *et al.*, J. Biotechnol. 56:135-142 (1997); Menzel *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 60:617-626 (1998)). También se ha mostrado que dos mutaciones en el gen *lpdA* del operón de *E. coli* aumentarán su capacidad para crecer de manera anaerobia (Kim *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771 (2007); Kim *et al.*, J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)). Se amplificó el gen *lpdA* de *K. pneumonia* mediante PCR usando ADN genómico (ATCC700721D) como molde y los cebadores KP-*lpdA*-Bam (5'-acacgcggatccaacgtcccg-3') (SEQ ID NO:) y KP-*lpdA*Nhe (5'-agcgctccgctagccgcttatg-3') (SEQ ID NO:). Se clonó el fragmento resultante en el vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen; Carlsbad CA), conduciendo al plásmido pCR-KP-*lpdA*.

Se realizó la sustitución de gen cromosómico usando un plásmido no replicante y el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* como medio de contraselección (Gay *et al.*, J. Bacteriol. 153:1424-1431 (1983)). El vector usado es pRE118 (ATCC87693) con las secuencias de *oriT* e IS delecionadas, que tiene 3,6 kb de tamaño y que porta el gen de resistencia a kanamicina. Se confirmó la secuencia, y el vector se denominó pRE118-V2 (véase la figura 34).

Se amplificaron los fragmentos de *E. coli* que flanqueaban al gen *lpdA* mediante PCR usando la combinación de

cebadores: ECaceF-Pst (5'-aagccgttgctgcagctcttgagc-3') (SEQ ID NO:) + EC-aceF-Bam2 (5'-atctccggcggtcggtacgctcg-3') (SEQ ID NO:) y EC-yacH-Nhe (5'-aaagcggctagccacgccc-3') (SEQ ID NO:) + EC-yacH-Kpn (5'-attacacgaggtaccaacg-3') (SEQ ID NO:). Un fragmento de BamHI-XbaI que contenía el gen *lpdA* de *K. pneumonia* se aisló del plásmido pCR-KP-*lpdA* y después se ligó en los fragmentos de *E. coli* anteriores digeridos con PstI + BamHI y NheI-KpnI respectivamente, y se digirió el plásmido pRE118-V2 con KpnI y PstI. Se sometió el plásmido resultante (denominado pRE118-M2,1 *lpdA* *yac*) a mutagénesis dirigida al sitio (SDM) usando la combinación de cebadores KP-*lpdA*-HisTyr-F (5'-atgctggcgtacaaaggtgtcc-3') (SEQ ID NO:) y (5'-ggacaccttgtagccagcat-3') (SEQ ID NO:) para la mutación del residuo His 322 para dar un residuo Tyr o cebadores KP-*lpdA*-GluLys-F (5'-atgcctacactaaaccagaagtgg-3') (SEQ ID NO:) y KP-*lpdA*-GluLys-R (5'-ccacttctggttagtgtaggcgat-3') (SEQ ID NO:) para la mutación del residuo Glu 354 para dar un residuo Lys. Se realizó PCR con la polimerasa Pfu Turbo (Stratagene; San Diego CA). Se verificó la secuencia de todo el fragmento así como la presencia de tan sólo las mutaciones deseadas. Se introdujo el plásmido resultante en células electrocompetentes de *E. coli* $\Delta adhE::Frt-\Delta ldhA::Frt$ mediante transformación. Se seleccionó el primer acontecimiento de integración en el cromosoma en placas de agar LB que contenían kanamicina (25 ó 50 mg/l). Se verificaron las inserciones correctas mediante PCR usando 2 cebadores, uno ubicado fuera de la región de inserción y uno en el gen de kanamicina (5'-aggcagttccatagatggc-3') (SEQ ID NO:). Se seleccionaron clones con la inserción correcta para su resolución. Se sometieron a cultivos secundarios dos veces en medio LB líquido simple a la temperatura deseada y se sembraron en placa diluciones en serie en placas de LB sin sal con sacarosa al 10%. Se examinaron los clones que crecieron en placas que contenían sacarosa para determinar la pérdida del gen de resistencia a kanamicina en medio agar LB con bajo contenido en sal y se verificó la sustitución del gen *lpdA* mediante PCR y secuenciación de la región que lo abarcaba. Se verificó la secuencia de la región de inserción, y es tal como se describe a continuación. Se seleccionó un clon (denominado 4-4-P1) con la mutación Glu354Lys. Después se sometió este clon a transducción con lisado P1 de *E. coli* $\Delta PflB::Frt$ conduciendo a la cepa ECKh-138 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA::K.p.lpdA322$).

En la figura 35 se muestra la secuencia de la región de ECKh-138 que abarca los genes *aceF* y *lpdA*. El gen *lpdA* de *K. pneumonia* está subrayado, y el codón cambiado en el mutante Glu354Lys está sombreado. En la figura 36 se muestra la comparación de secuencias de proteína de *lpdA* de *E. coli* nativo y *lpdA* de *K. pneumonia* mutante.

Para evaluar el beneficio de usar *lpdA* de *K. pneumoniae* en una cepa de producción de BDO, se transformaron las cepas huésped AB3 y ECKh-138 con plásmidos que expresaban la ruta de BDO completa a partir de promotores inducibles fuertes. Específicamente, se expresaron *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis* en el plásmido de número de copias medio pZA33, y se expresaron *Cat2* de *P. gingivalis* y *AdhE2* de *C. acetobutylicum* en el plásmido de número de copias alto pZE13. Estos plásmidos se han descrito en la bibliografía (Lutz y H. Bujard, Nucleic Acids Res 25:1203-1210 (1997)), y su uso para la expresión de la ruta de BDO se describe en el ejemplo XIII y en el documento WO2008/115840.

Se hicieron crecer células de manera anaerobia a 37°C en medio mínimo M9 (Na_2HPO_4 6,78 g/l, KH_2PO_4 3,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH_4Cl 1,0 g/l, $MgSO_4$ 1 mM, $CaCl_2$ 0,1 mM) suplementado con glucosa 20 g/l, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 100 mM para mejorar la capacidad tamponante, tiamina 10 µg/ml y los antibióticos apropiados. Se establecieron condiciones microaerobias purgando inicialmente botellas anaerobias tapadas con nitrógeno durante 5 minutos, después perforando el septo con una aguja de 23G tras la inoculación. Se mantuvo la aguja en la botella durante el crecimiento para permitir que una pequeña cantidad de aire entrara en las botellas. Se añadió IPTG 0,25 mM cuando la DO600 alcanzó aproximadamente 0,2 para inducir los genes de la ruta, y se tomaron muestras para su análisis cada 24 horas tras la inducción. Se analizaron los sobrenadantes de cultivo para detectar BDO, 4HB y otros subproductos tal como se describe en el ejemplo II y en el documento WO2008/115840. La producción de BDO y 4HB en ECKh-138 fue significativamente superior tras 48 horas que en AB3 o el huésped usado en el trabajo anterior, MG1655 $\Delta ldhA$ (figura 37).

Sustitución de promotor de PDH. Anteriormente se mostró que la sustitución del represor *pdhR* por una fusión de transcripción que contiene el sitio de unión a Fnr, uno de los promotores *pflB*, y su sitio de unión a ribosoma (RBS), conduciendo por tanto a la expresión del operón *aceEF-lpd* por un promotor anaerobio, debía conducir al aumento de actividad *pdh* de manera anaerobia (Zhou *et al.*, Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008)). Se construyeron una fusión que contenía el sitio de unión a Fnr, el promotor *pflB*-p6 y un sitio de unión RBS mediante PCR con solapamiento. Se amplificaron dos fragmentos, uno usando los cebadores *aceE*-upstream-RC (5'-tgacatgaacacctaccttctgtgctgtgccagtggtgctgtgatatagaag-3') (SEQ ID NO:) y *pflBp6-Up-Nde* (5'-ataataatcatatgaaccatgcgagttacgggctataagccaggcg-3') (SEQ ID NO:) y el otro usando los cebadores *aceE*-EcoRV-EC (5'-agtttttcgatatctgcatcagacacccggcaccattgaaacgg-3') (SEQ ID NO:) y *aceE*-upstream (5'-ctggcacaggcacagaaggttaggtgttacatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatc-3') (SEQ ID NO:). Se ensamblaron los dos fragmentos mediante PCR con solapamiento, y se digirió el fragmento de ADN final con las enzimas de restricción NdeI y BamHI. Posteriormente se introdujo este fragmento en el sentido de 5' del *aceE* del operón de *E. coli* usando pRE118-V2 tal como se describió anteriormente. Se realizó la sustitución en las cepas ECKh-138 y ECKh-422. Se verificó la secuencia de nucleótidos que abarcaba la región 5' del gen *aceE* y se muestra en la figura 37. La figura 37 muestra la secuencia de nucleótidos del extremo 5' del gen *aceE* fusionado al promotor *pflB*-p6 y sitio de unión a ribosoma (RBS). La secuencia en cursiva en 5' muestra el inicio del gen *aroP*, que se transcribe en el sentido

opuesto al operón pdh. La secuencia en cursiva en 3' muestra el inicio del gen aceE. En mayúsculas: RBS de pflB. Subrayado: sitio de unión de FNR. En negrita: secuencia de promotor pflB-p6.

Sustitución de promotor lpdA. Se amplificó la región de promotor que contenía el sitio de unión a fnr, el promotor pflB-p6 y el RBS del gen pflB mediante PCR usando un molde de ADN cromosómico y los cebadores aceF-pflBp6-fwd (5'-agacaaatcggttgccgtttgtaagccaggcgagatatgatctatc-3') (SEQ ID NO:) y lpdA-RBS-B-rev (5'-gagtttgattcagttactcatcatgtaaacctctctgtgtgatag-3') (SEQ ID NO:). Se amplificó el plásmido 2-4a mediante PCR usando los cebadores B-RBS-lpdA directo (5'-ctatatcacagcaagaaggtaggtgttacatgatgagttgaaatcaaaactc-3') (SEQ ID NO:) y pflBp6-aceF-rev (5'-gatatagatcatatctgcctggcttaacaaacggcaaccgattgtct-3') (SEQ ID NO:). Se ensamblaron los dos fragmentos resultantes usando el kit de clonación BPS (BPS Bioscience; San Diego CA). Se verificó la secuencia del constructo resultante y se introdujo en la cepa ECKh-439 usando el método de pRE118-V2 descrito anteriormente. En la figura 39 se muestra la secuencia de nucleótidos que abarca la región de aceF-lpdA en la cepa resultante ECKh-456.

Se sometieron a prueba la cepa huésped ECKh-439 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L ackA fimD:: sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis* fimD:: sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*), cuya construcción se describe a continuación, y los derivados ECKh-455 y ECKh-456 con sustitución de promotor pdhR y lpdA, para determinar la producción de BDO. Se transformaron las cepas con pZS*13 que contenía Cat2 de *P. gingivalis* y Ald de *C. beijerinckii* para proporcionar una ruta de BDO completa. Se cultivaron células en medio mínimo M9 suplementado con glucosa 20 g/l tal como se describió anteriormente. 48 horas tras la inducción con IPTG 0,2 mM, las concentraciones de BDO, 4HB y piruvato eran tal como se muestra en la figura 40. Las cepas con sustitución de promotor producen ligeramente más BDO que la original isogénica.

Estos resultados demostraron que la expresión de piruvato deshidrogenasa aumentaba la producción de BDO en cepas productoras de BDO.

EJEMPLO XV

Cepas productoras de BDO que expresan citrato sintasa y aconitasa

Este ejemplo describe aumentar la actividad de citrato sintasa y aconitasa para aumentar la producción de BDO. Se encontró que una mutación R163L en gltA mejoraba la producción de BDO. Adicionalmente, se usó una desactivación de arcA para mejorar la producción de BDO.

Computacionalmente, se determinó que se requiere el flujo a través de citrato sintasa (CS) y aconitasa (ACONT) para alcanzar el rendimiento teórico máximo de 1,4-butanodiol (véanse también los documentos WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación estadounidense 2009/0047719, publicación estadounidense 2009/0075351). La falta de actividad CS o ACONT reducirá el rendimiento teórico máximo en un 14% en condiciones anaerobias. En presencia de un aceptor de electrones externo, el rendimiento máximo se reduce en un 9% o un 6% sin flujo a través de CS o ACONT suponiendo la ausencia o presencia de actividad PEPC, respectivamente. Como con la piruvato deshidrogenasa (PDH), la importancia de CS y ACONT se amplifica en gran medida en el contexto de cepa desactivada en el que ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH y PFLi están desactivados (diseño n.º 439) (véanse el documento WO 2009/023493 y la publicación estadounidense 2009/0047719). El diseño de cepa de OptKnock mínimo descrito en el documento WO 2009/023493 y la publicación estadounidense 2009/0047719 tenía una delección adicional más allá de ECKh-138, el gen mdh, que codifica para malato deshidrogenasa. Se pretende que la delección de este gen impida el flujo hacia succinato a través del ciclo de TCA reductor. La delección de mdh se realizó usando el método de recombinación homóloga red λ (Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000)). Se usaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar mediante PCR el gen de resistencia a cloranfenicol (CAT) flanqueado por sitios de FRT de pKD3:

S-mdh-Kan 5' - **TAT TGT GCA TAC AGA TGA ATT TTT ATG CAA ACA GTC AGC CCT GAA GAA GGG TGT**
AGG CTG GAG CTG CTT C - 3' (SEQ ID NO:)

AS-mdh-Kan 5' - **CAA AAA ACC GGA GTC TGT GCT CCG GTT TTT TAT TAT CCG CTA ATC AAT TAC ATA**
TGA ATA TCC TCC TTA G - 3' (SEQ ID NO:).

Las regiones subrayadas indican homología con el plásmido pKD3 y la secuencia en negrita se refiere a la homología de secuencia en el sentido de 5' y 3' del ORF de mdh. Tras la purificación, se sometió el producto de PCR a electroporación en células electrocompetentes ECKh-138 que se habían transformado por pRedET (tet) y preparado según las instrucciones del fabricante (www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf). El producto de PCR se diseñó de modo que se integró en el genoma de ECKh-138 en una región en el sentido de 5' del gen mdh, tal como se muestra en la figura 41.

Se seleccionaron recombinantes para la resistencia a cloranfenicol y se purificaron en línea. Se verificó la pérdida del gen mdh y la inserción de CAT mediante PCR de diagnóstico. Para eliminar el gen CAT, se transformó un

plásmido sensible a la temperatura pCP20 que contenía una FLP recombinasa (Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000)) en la célula a 30°C y se seleccionó para la resistencia a ampicilina (AMP). Se hicieron crecer los transformantes de manera no selectiva a 42°C durante la noche para inducir térmicamente la síntesis de FLP y para provocar la pérdida del plásmido. Después se purificó el cultivo en línea, y se sometieron a prueba colonias individuales para determinar la pérdida de todas las resistencias a antibiótico. La mayoría perdieron el gen de resistencia flanqueado por FRT y el plásmido cooperador FLP de manera simultánea. También se dejó una cicatriz de "FRT". La cepa resultante se denominó ECKh-172.

CS y ACONT no son altamente activos ni se expresan altamente en condiciones anaerobias. Para ello se deletó el gen *arcA*, que codifica para un regulador global del ciclo de TCA. *ArcA* funciona durante condiciones microaerobias para inducir la expresión de productos génicos que permiten la actividad de enzimas del metabolismo central que son sensibles a bajos niveles de oxígeno, *aceE*, *pflB* y *adhE*. Se mostró que, de manera microaerobia, una delección en *arcA/arcB* aumenta las actividades específicas de los genes *ldh*, *icd*, *gltA*, *mdh* y *gdh* (Salmon *et al.*, J. Biol. Chem. 280:15084-15096 (2005); Shalel-Levanon *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 92(2):147-159 (2005). Se amplificaron las regiones en sentido de 5' y 3' del gen *arcA* de *E. coli* MG1655 mediante PCR usando los cebadores *ArcA-up-EcoRI* (5'-ataataatagaattcggttgctacctaataatgccaactaaatgcaaacagg-3') (SEQ ID NO:) con *ArcA-up-KpnI* (5'-tattattatggtaccaatatcatgcagcaaacggtgcaacattgccg-3') (SEQ ID NO:) y *ArcA-down-EcoRI* (5'-tgatctggaagaattcatcggtttaccacggtcaaaaaaacggcg-3') (SEQ ID NO:) con *ArcA-down-PstI* (5'-ataaaaccctgcagcggaaacgaagtttatccattttggttacctg-3') (SEQ ID NO:), respectivamente. Posteriormente se digirieron estos fragmentos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* (fragmento en el sentido de 5') y *EcoRI* y *PstI* (en el sentido de 3'). Después se ligaron en el plásmido pRE118-V2 digerido con *PstI* y *KpnI*, conduciendo al plásmido pRE118- Δ *arcA*. Se verificó la secuencia del plásmido pRE118- Δ *arcA*. Se introdujo pRE118- Δ *arcA* en células electrocompetentes de *E. coli*, cepa ECKh-172 (Δ *adhE* Δ *ldhA* Δ *pflB* Δ *lpdA*::K.p.lpdA322 Δ *mdh*). Tras la integración y resolución en placas de LB sin sal con sacarosa tal como se describió anteriormente, se verificó la delección del gen *arcA* en el cromosoma de la cepa resultante ECKh-401 mediante secuenciación y se muestra en la figura 42.

El gen *glcA* de *E. coli* codifica para una citrato sintasa. Anteriormente se mostró que este gen se inhibe de manera alostérica mediante NADH, y se han identificado los aminoácidos que participan en esta inhibición (Pereira *et al.*, J. Biol. Chem. 269(1):412-417 (1994); Stokell *et al.*, J. Biol. Chem. 278(37):35435-35443 (2003)). Se amplificó el *glcA* de *E. coli* MG1655 mediante PCR usando los cebadores *glcA-up* (5'-ggaagagaggctgtaccagaaagccacagcagga-3') (SEQ ID NO:) y *glcA-PstI* (5'-gtaatcactgcgtaagcgccatgccccggcggttaattc-3') (SEQ ID NO:). Se clonó el fragmento amplificado en pRE118-V2 tras la digestión con *KpnI* y *PstI*. El plásmido resultante se denominó pRE118-*glcA*. Después se sometió este plásmido a mutagénesis dirigida al sitio (SDM) usando los cebadores R163L-f (5'-attgccgcgttcctctgctgtcg-3') (SEQ ID NO:) y R163L-r (5'-cgacagcaggaggaacgcggcaat-3') (SEQ ID NO:) para cambiar el residuo Arg 163 por un residuo Lys. Se verificó la secuencia de todo el fragmento mediante secuenciación. Se usó una variación del método de recombinación homóloga red λ (Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000)) para sustituir el gen *glcA* nativo por el alelo mutante R163L sin dejar una cicatriz de Frt. El procedimiento de recombinación general es el mismo que el usado para realizar la delección de *mdh* descrita anteriormente. En primer lugar, se hizo que la cepa ECKh-172 fuera resistente a estreptomycin introduciendo una mutación nula en *rpsL* usando el método de recombinación homóloga red λ . A continuación, se realizó una recombinación para sustituir toda la región codificante de *glcA* de tipo natural en esta cepa por un casete compuesto por un gen de resistencia a kanamicina (*kanR*) y una copia de tipo natural del gen *rpsL* de *E. coli*. Cuando se introduce en una cepa de *E. coli* que alberga una mutación nula de *rpsL*, el casete hace que las células cambien de resistencia al fármaco estreptomycin a sensibilidad a estreptomycin. Después se introdujeron fragmentos de ADN que incluyeron cada una de las versiones mutantes del gen *glcA* junto con extremos homólogos apropiados, y se sometió a prueba el crecimiento de colonias resultantes en presencia de estreptomycin. Esto realizó la selección de cepas en las que el casete *kanR/rpsL* se había sustituido por el gen *glcA* mutante. Se confirmó la inserción del gen mutante en el locus correcto mediante análisis de PCR y secuenciación de ADN. La cepa resultante se denominó ECKh-422, y tiene el genotipo Δ *adhE* Δ *ldhA* Δ *pflB* Δ *lpdA*::K.p.lpdA322 Δ *mdh* Δ *arcA* *glcA*R163L. Se verificó la región que abarcaba el gen *glcA* mutado de la cepa ECKh-422 mediante secuenciación, tal como se muestra en la figura 43.

Después se evaluaron extractos en bruto de las cepas ECKh-401 y el mutante de *glcA* R163L ECKh-422 para determinar la actividad citrato sintasa. Se recogieron células mediante centrifugación a 4.500 rpm (Beckman-Coulter, Allegra X-15R; Fullerton CA) durante 10 min. Se resuspendieron los sedimentos en 0,3 ml de reactivo BugBuster (Novagen/EMD; San Diego CA) con benzonasa y lisozima, y la lisis avanzó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se obtuvo un lisado libre de células mediante centrifugación a 14.000 rpm (centrifugadora Eppendorf 5402; Hamburgo, Alemania) durante 30 min a 4°C. Se determinaron las proteínas celulares en la muestra usando el método de Bradford (Bradford, Anal. Biochem. 72:248-254 (1976)).

Se determinó la actividad citrato sintasa siguiendo la formación de coenzima A libre (HS-CoA), que se libera a partir de la reacción de acetil-CoA con oxaloacetato. El grupo tiol libre de HS-CoA reacciona con 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). Después se monitoriza la concentración de TNB mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a 410 nm (máximo a 412 nm). La mezcla de ensayo contenía tampón Tris/HCl 100 mM (pH 7,5), acetil-CoA 20 mM, DTNB 10 mM y oxaloacetato 20 mM. Para la

evaluación de la inhibición de NADH, también se añadió NADH 0,4 mM a la reacción. Se inició el ensayo añadiendo 5 microlitros del extracto celular, y se midió la velocidad de reacción siguiendo el cambio de absorbancia a lo largo del tiempo. Una unidad de actividad específica se define como los μmol de producto convertidos por minuto por mg de proteína.

La figura 44 muestra la actividad citrato sintasa de producto del gen *gltA* de tipo natural y el mutante R163L. Se realizó el ensayo en ausencia o presencia de NADH 0,4 mM.

Se transformaron las cepas ECKh-401 y ECKh-422 con plásmidos que expresaban toda la ruta de BDO. Se expresaron *sucCD* de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis* y *sucA* de *M. bovis* en el plásmido de bajo número de copias pZS*13, y se expresaron *Cat2* de *P. gingivalis* y *AdhE2* de *C. acetobutylicum* en el plásmido de número de copias medio pZE23. Se hicieron crecer cultivos de estas cepas de manera microaerobia en medio mínimo M9 suplementado con glucosa 20 g/l y los antibióticos apropiados tal como se describió anteriormente. En la figura 45 se muestran las concentraciones de 4HB y BDO a las 48 horas tras la inducción, como promedio a partir de cultivos duplicados. Ambas son mayores en ECKh-422 que en ECKh-401, demostrando que la actividad citrato sintasa potenciada debida a la mutación de *gltA* da como resultado un flujo aumentado hacia la ruta de BDO.

Se pretendía que las modificaciones de cepa huésped descritas en esta sección redirigieran el flujo de carbono a través del ciclo de TCA oxidativo, lo cual concuerda con el diseño de cepa de OptKnock descrito en el documento WO 2009/023493 y la publicación estadounidense 2009/0047719. Para demostrar que el flujo se dirigía realmente a través de esta ruta, se realizó un análisis de flujo de ^{13}C usando la cepa ECKh-432, que es una versión de ECKh-422 en la que la ruta aguas arriba está integrada en el cromosoma (tal como se describe en el ejemplo XVII). Para completar la ruta de BDO, se expresaron *Cat2* de *P. gingivalis* y *Ald* de *C. beijerinckii* a partir de pZS*13. Se hicieron crecer cuatro cultivos paralelos en medio mínimo M9 (Na_2HPO_4 6,78 g/l, KH_2PO_4 3,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH_4Cl 1,0 g/l, MgSO_4 1 mM, CaCl_2 0,1 mM) que contenía glucosa total 4 g/l con cuatro razones de marcaje diferentes (^{1-13}C , sólo el primer átomo de carbono en la molécula de glucosa está marcado con ^{13}C ; uniforme- ^{13}C , todos los átomos de carbono son ^{13}C):

1. el 80% en moles sin marcar, el 20% en moles uniforme- ^{13}C
2. el 10% en moles sin marcar, el 90% en moles uniforme- ^{13}C
3. el 90% en moles 1- ^{13}C , el 10% en moles uniforme- ^{13}C
4. el 40% en moles 1- ^{13}C , el 60% en moles uniforme- ^{13}C

Se hicieron crecer cultivos sin marcar en paralelo por duplicado, de los cuales se tomaron muestras frecuentes para evaluar la velocidad de crecimiento, velocidad de captación de glucosa y velocidades de formación de producto. Al final de la fase exponencial, se recogieron los cultivos marcados, se aisló la proteína y se hidrolizó para dar aminoácidos, y se analizó la distribución de marcador de los aminoácidos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) tal como se describió anteriormente (Fischer y Sauer, Eur. J. Biochem. 270:880-891 (2003)). Además, la distribución de marcador de 4HB y BDO secretados en el caldo a partir de los cultivos marcados se analizó mediante CG-EM tal como se describe en el documento WO2008115840. Se usaron colectivamente estos datos para calcular la distribución de flujo intracelular usando métodos establecidos (Suthers *et al.*, Metab. Eng. 9:387-405 (2007)). En la figura 46 se muestran los flujos metabólicos centrales resultantes y los intervalos de confianza del 95% asociados. Los valores son flujos molares normalizados a una velocidad de captación de glucosa de 1 mmol/h. El resultado indica que el flujo de carbono se dirige a través de citrato sintasa en el sentido oxidativo, y que la mayor parte del carbono entra en la ruta de BDO en vez de completar el ciclo de TCA. Además, confirma que no hay esencialmente nada de flujo entre malato y oxaloacetato debido a la delección de *mdh* en esta cepa.

La ventaja de usar una cepa desactivada tal como cepas diseñadas usando OptKnock para la producción de BDO (véanse el documento WO 2009/023493 y la publicación estadounidense 2009/0047719) puede observarse comparando perfiles de fermentación típicos de ECKh-422 con los de la cepa original ECKh-138, en la que se produce BDO a partir de succinato a través del ciclo de TCA reductor (véase la figura 47). Se realizaron fermentaciones con 1 l de volumen de cultivo inicial en biorreactores Biostat B+ de 2 l (Sartorius; Cedex Francia) usando medio mínimo M9 suplementado con glucosa 20 g/l. Se controló la temperatura a 37°C, y se controló el pH a 7,0 usando NH_4OH o Na_2CO_3 2 M. Se hicieron crecer las células de manera aerobia hasta una DO600 de aproximadamente 10, momento en el cual se indujeron los cultivos con IPTG 0,2 mM. Una hora tras la inducción, se redujo la velocidad de flujo de aire hasta 0,02 litros convencionales por minuto para condiciones microaerobias. Se fijó la velocidad de agitación a 700 rpm. Se alimentó glucosa concentrada para mantener la concentración de glucosa en el recipiente entre 0,5 y 10 g/l. Ambas cepas estaban transformadas con plásmidos que portaban toda la ruta de BDO, como en los ejemplos anteriores. En ECKh-138, acetato, piruvato y 4HB dominan la fermentación, mientras que con ECKh-422 el producto principal es BDO.

EJEMPLO XVI

Expresión en cepas de BDO de fosfoenolpiruvato carboxicinasas

Este ejemplo describe la utilización de fosfoenolpiruvato carboxicinasas (PEPCK) para potenciar la producción de BDO. Se usó el gen de PEPCK de *Haemophilus influenza* para la expresión heteróloga.

Computacionalmente, se demostró que se requiere la conversión generadora de ATP de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato para alcanzar el rendimiento teórico máximo de 1,4-butanodiol (véanse también los documentos WO2008/115840, WO 2009/023493, publicación estadounidense 2009/0047719, publicación estadounidense 2009/0075351). Se mostró que la falta de actividad PEPCK reduce el rendimiento teórico máximo de BDO en un 12% suponiendo condiciones anaerobias y en un 3% suponiendo que está presente un aceptor de electrones externo tal como nitrato u oxígeno.

En organismos tales como *E. coli*, PEPCK funciona en el sentido gluconeogénico y de consumo de ATP desde oxaloacetato hacia fosfoenolpiruvato. Se ha planteado la hipótesis de que limitaciones cinéticas de PEPCK de *E. coli* impiden que catalice eficazmente la formación de oxaloacetato a partir de PEP. *E. coli* utiliza de manera natural PEP carboxilasa (PPC), que no genera ATP pero se requiere para el crecimiento eficaz, para formar oxaloacetato a partir de fosfoenolpiruvato. Por tanto, se sometieron a prueba tres enzimas PEPCK no nativas (tabla 26) para determinar su capacidad para complementar el crecimiento de una cepa mutante de PPC de *E. coli* en medios mínimos con glucosa.

Tabla 26. Fuentes de secuencias de fosfoenolpiruvato carboxicinasas.

Cepa fuente de PEPCK	Número de registro, secuencia de referencia de GenBank
<i>Haemophilus influenza</i>	NC_000907.1
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	YP_001343536.1
<i>Mannheimia succiniciproducens</i>	YP_089485.1

Estudios de complementación del crecimiento implicaron la expresión basada en plásmido de los genes candidatos en mutante Δppc de *E. coli* JW3978 obtenido a partir de la colección de Keio (Baba *et al.*, Molecular Systems Biology 2:2006.0008 (2006)). Se clonaron los genes detrás del promotor PA1lacO-1 en los vectores de expresión pZA23 (número de copias medio) y pZE13 (número de copias alto). Estos plásmidos se han descrito anteriormente (Lutz y Bujard, Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997)), y su uso en la expresión de genes de la ruta de BDO se ha descrito anteriormente en el documento WO2008115840.

Se hicieron crecer cultivos previos de manera aerobia en medios mínimos M9 con glucosa 4 g/l. Se suplementaron todos los cultivos previos con aspartato (2 mM) para proporcionar a los mutantes Δppc una fuente para generar productos intermedios del ciclo de TCA independientemente de la expresión de PEPCK. También se usaron medios mínimos M9 en las condiciones de prueba con glucosa 4 g/l, pero no se añadió aspartato y se añadió IPTG hasta 0,5 mM. La tabla 27 muestra los resultados de los estudios de complementación del crecimiento.

Tabla 27. Complementación de mutantes Δppc con PEPCK de *H. influenzae*, *A. succinogenes* y *M. succiniciproducens* cuando se expresan a partir de vectores pZA23 o pZE13.

Cepa fuente de PEPCK	Vector	Tiempo (h)	DO ₆₀₀
<i>H. influenzae</i>	pZA23BB	40	0,950
Δppc Control	pZA23BB	40	0,038
<i>A. succinogenes</i>	pZA23BB	40	0,055
<i>M. succiniciproducens</i>	pZA23BB	40	0,214
<i>A. succinogenes</i>	pZE13BB	40	0,041
<i>M. succiniciproducens</i>	pZE13BB	40	0,024
Δppc Control	pZE13BB	40	0,042

Se encontró que PEPCK de *Haemophilus influenza* complementaba el crecimiento en mutante Δppc de *E. coli* de la mejor manera entre los genes que se sometieron a prueba en el examen basado en plásmido. Entonces se integró este gen en el locus de PPC de *E. coli* de tipo natural (MG1655) usando el método de contraselección de SacB con pRE118-V2 comentado anteriormente (Gay *et al.*, J. Bacteriol. 153:1424-1431 (1983)). Se integró PEPCK conservando el promotor de PPC nativo de *E. coli*, pero usando el terminador de PEPCK no nativo. En la figura 48 se muestra la secuencia de esta región tras la sustitución de *ppc* por *pepck* de *H. influenzae*. La región codificante de *pepck* está subrayada.

Se aplicaron técnicas para evolución adaptativa para mejorar la tasa de crecimiento del mutante de *E. coli* ($\Delta ppc::H. inf pepCK$). Se usaron medios mínimos M9 con glucosa 4 g/l y bicarbonato de sodio 50 mM para cultivar y hacer evolucionar esta cepa en un entorno anaerobio. Se usó la alta concentración de bicarbonato de sodio para impulsar el equilibrio de la reacción de PEPCK hacia la formación de oxaloacetato. Para mantener un crecimiento

exponencial, se diluyó el cultivo 2 veces cada vez que se alcanzó una DO600 de 0,5. Tras aproximadamente 100 generaciones a lo largo de 3 semanas de evolución adaptativa, las tasas de crecimiento anaerobio mejoraron desde aproximadamente 8 h hasta la de tipo natural, de aproximadamente 2 h. Tras la evolución, se aislaron colonias individuales, y se comparó el crecimiento en botellas anaerobias con el del mutante inicial y la cepa de tipo natural (véase la figura 49). Se usaron medio M9 con glucosa 4 g/l y bicarbonato de sodio 50 mM.

Después se repitió el procedimiento de sustitución génica *ppc/pepck* descrito anteriormente, esta vez usando las cepas productoras de BDO ECKh-432 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfkB \Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA gltAR163L \Delta ackA fimD::sucCD$ de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis fimD::sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri*) y ECKh-439 como huéspedes. Estas cepas contienen las potenciaciones del ciclo de TCA comentadas anteriormente así como la ruta aguas arriba integrada en el cromosoma. ECKh-439 es un derivado de ECKh-432 que tiene el gen *ackA* delecionado, que codifica para acetato cinasa. Esta delección se realizó usando el método de contraselección de *sacB* descrito anteriormente.

Se utilizó el derivado $\Delta ppc::H. inf$ *pepCK* de ECKh-439, denominado ECKh-453, en una fermentación. La ruta de BDO aguas abajo se suministró mediante *pZS*13* que contenía *Cat2* de *P. gingivalis* y *Ald* de *C. beijerinckii*. Esto se realizó con un volumen de cultivo inicial de 1 l en biorreactores Biostat B+ de 2 l (Sartorius) usando medio mínimo M9 suplementado con glucosa 20 g/l y $NaHCO_3$ 50 mM. Se controló la temperatura a 37°C, y se controló el pH a 7,0 usando NH_4OH o Na_2CO_3 2 M. Se hicieron crecer las células de manera aerobia hasta una DO600 de aproximadamente 2, momento en el cual se indujeron los cultivos con IPTG 0,2 mM. Una hora tras la inducción, se redujo la velocidad de flujo de aire hasta 0,01 litros convencionales por minuto para condiciones microaerobias. Inicialmente se estableció la velocidad de agitación a 700 rpm. Se aumentó gradualmente la velocidad de aireación a través de la fermentación a medida que aumentó la densidad de cultivo. Se alimentó una disolución de glucosa concentrada para mantener la concentración de glucosa en el recipiente entre 0,5 y 10 g/l. En la figura 50 se muestra el perfil de productos. El fenotipo observado, en el que se producen BDO y acetato en una razón molar de aproximadamente uno con respecto a uno, es altamente similar al predicho en el documento WO 2009/023493 para el diseño n.º 439 (ADHER, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi). Se consideró que la delección dirigida a la reacción de ASPT era innecesaria ya que el flujo natural a través de aspartato amoniaco-liasas es bajo.

Una característica clave de las cepas de OptKnock es que la producción del metabolito de interés está generalmente acoplada al crecimiento y, además, que la producción debe producirse durante el crecimiento exponencial así como en la fase estacionaria. Se evaluó el potencial de acoplamiento al crecimiento de ECKh-432 y ECKh-453 mediante crecimiento en botellas microaerobias con toma de muestras frecuente durante la fase exponencial. Se usó medio M9 que contenía glucosa 4 g/l y o bien $NaHCO_3$ 10 mM (para ECKh-432) o bien $NaHCO_3$ 50 mM (para ECKh-453), y se incluyó IPTG 0,2 mM a partir de la inoculación. Se usaron agujas de 18G para el crecimiento microaerobio de ECKh-432, mientras que se sometieron a prueba agujas tanto de 18G como de 27G para ECKh-453. Las agujas de calibre mayor dan como resultado menos aireación. Tal como se muestra en la figura 51, ECKh-432 no comienza a producir BDO hasta que se han consumido 5 g/l de glucosa, correspondiendo al inicio de la fase estacionaria. ECKh-453 produce BDO de manera más uniforme a lo largo de todo el experimento. Además, el acoplamiento al crecimiento mejora a medida que se reduce la aireación del cultivo.

EJEMPLO XVII

Integración de genes codificantes de la ruta de BDO en sitios de integración específicos

Este ejemplo describe la integración de diversos genes de la ruta de BDO en el locus *fimD* para proporcionar estabilidad y una expresión más eficaz.

Se ha integrado la ruta de BDO aguas arriba completa, que conduce a 4HB, en el cromosoma de *E. coli* en el locus *fimD*. Se integró la rama de succinato de la ruta aguas arriba en el cromosoma de *E. coli* usando el método de recombinación homóloga red λ (Datsenko y Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000)). La cepa de *E. coli* receptora era ECKh-422 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfkB \Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA gltAR163L$). Se insertó un fragmento de ADN policistrónico que contenía un promotor, el gen *sucCD*, el gen *sucD* y el gen *4hbd* y una secuencia de terminador, en el sitio AflIII del plásmido pKD3. Se usaron los siguientes cebadores para amplificar el operón junto con el marcador de cloranfenicol del plásmido. Las secuencias subrayadas son homólogas al sitio de inserción diana.

5'-GTTTGCACGCTATAGCTGAGGTTGTTGTCTTCCAGCAACGTACCGTATACAA

TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC-3' (SEQ ID NO:)

5'-GCTACAGCATGTCACACGATCTCAACGGTCGGATGACCAATCTGGCTGGTAT

GGGAATTAGCCATGGTCC-3' (SEQ ID NO:)

Tras el tratamiento con DpnI y la electroforesis de ADN, se usó el producto de PCR purificado para transformar la cepa de *E. coli* que albergaba el plásmido pKD46. Se seleccionó la cepa candidata en placas que contenían cloranfenicol. Se purificó ADN genómico de la cepa candidata. Se amplificó la secuencia de inserción y se confirmó mediante secuenciación de ADN. Se eliminó el marcador de resistencia a cloranfenicol del cromosoma mediante flipasa. En la figura 52 se muestra la secuencia de nucleótidos de la región tras la inserción y eliminación de marcador.

Se integró la rama de alfa-cetoglutarato de la ruta aguas arriba en el cromosoma mediante recombinación homóloga. El plásmido usado en esta modificación se derivó del vector pRE118-V2, tal como se menciona en el ejemplo XIV, que contiene un gen de resistencia a kanamicina, un gen que codifica para el levansacarasa (sacB) y un origen de replicación condicional de R6K. El plásmido de integración también contenía una secuencia policistónica con un promotor, el gen *sucA*, el gen *4hbd* de *C. kluyveri*, y un terminador que estaba insertado entre dos fragmentos de ADN de 1,5 kb que son homólogos a las regiones flanqueantes del sitio de inserción diana. Se usó el plásmido resultante para transformar la cepa de *E. coli*. Se seleccionó el candidato de integración en placas que contenían kanamicina. Se verificó el sitio de integración correcto mediante PCR. Para resolver el marcador de antibiótico a partir del cromosoma, se seleccionaron las células para crecimiento en medio que contenía sacarosa. Se verificó la cepa final mediante PCR y secuenciación de ADN. En la figura 53 se muestra la secuencia de nucleótidos de la región cromosómica tras la inserción y eliminación del marcador.

La cepa ECKh-432 con integración de ruta aguas arriba resultante se transformó con un plásmido que albergaba los genes de la ruta aguas abajo. El constructo fue capaz de producir BDO a partir de glucosa en medio mínimo (véase la figura 54).

EJEMPLO XVIII

Uso de un sistema de captación de sacarosa distinto de fosfotransferasa para reducir la formación de subproducto piruvato

Este ejemplo describe la utilización de un sistema de captación de sacarosa distinto de fosfotransferasa (PTS) para reducir piruvato como subproducto en la conversión de sacarosa en BDO.

Las cepas diseñadas mediante ingeniería genética para la utilización de sacarosa a través de un sistema de fosfotransferasa (PTS) producen cantidades significativas de piruvato como subproducto. Por tanto, puede usarse el uso de un sistema de sacarosa distinto de PTS para disminuir la formación de piruvato dado que la importación de sacarosa no irá acompañada por la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato. Esto aumentará la combinación de PEP y el flujo hacia oxaloacetato a través de PPC o PEPCK.

Se realizó la inserción de un operón de sacarosa distinto de PTS en la región de *rrnC*. Para generar un producto de PCR que contenía los genes de sacarosa distintos de PTS flanqueados por regiones de homología con respecto a la región de *rrnC*, se usaron dos oligonucleótidos para amplificar mediante PCR los *csc* de Mach1™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Esta cepa es una descendiente de la cepa W que es una cepa de *E. coli* que se sabe que es capaz de catabolizar sacarosa (Orencio-Trejo *et al.*, *Biotechnology Biofuels* 1:8 (2008)). Se derivó la secuencia a partir de la cepa *E. coli* W KO11 (registro AY314757) (Shukla *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 26:689-693 (2004)) e incluye genes que codifican para una sacarosa permeasa (*cscB*), D-fructocinasa (*cscK*), sacarosa hidrolasa (*cscA*) y un represor específico de sacarosa relacionado con *Lacl* (*cscR*). Se eliminaron eficazmente los primeros 53 aminoácidos de *cscR* mediante la colocación del cebador AS. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron: *rrnC* 23S del S-CSC 5'-**TGT GAG TGA AAG TCA CCT GCC TTA ATA TCT CAA AAC TCA TCT TCG GGT GAC GAA ATA TGG CGT GAC TCG ATA C-3'** (SEQ ID NO:) y *rrnC* 23S del AS-CSC 5'-**TCT GTA TCA GGC TGA AAA TCT TCT CTC ATC CGC CAA AAC AGC TTC GGC GTT AAG ATG CGC GCT CAA GGA C-3'** (SEQ ID NO:). Las regiones subrayadas indican homología con el operón *csc*, y la secuencia en negrita se refiere a homología de secuencia en el sentido de 5' y 3' de la región de *rrnC*. En la figura 55 se muestra la secuencia de todo el producto de PCR.

Tras la purificación, se sometió el producto de PCR a electroporación en células electrocompetentes MG1655 que se habían transformado con pRedET (tet) y preparado según las instrucciones del fabricante (www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf). El producto de PCR se diseñó para integrarse en el genoma en la región de *rrnC* del cromosoma. Delecionó eficazmente 191 nucleótidos en el sentido de 5' de *rrlC* (ARNr 23S), todos ellos del gen de ARNr *rrlC* y 3 nucleótidos en el sentido de 3' de *rrlC* y los sustituyó por el operón de sacarosa, tal como se muestra en la figura 56.

Se hicieron crecer los transformantes en medio comercial mínimo M9 con sacarosa al 0,4% y se sometieron a prueba colonias individuales para determinar la presencia del operón de sacarosa mediante PCR de diagnóstico. Se transfirió toda la región de *rrnC::cscAKB* a la cepa huésped de BDO ECKh-432 mediante transducción de P1 (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001), dando como resultado ECKh-463 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \Delta gltAR163L \Delta fimD::sucCD$ de *E. coli*, *sucD* de *P. gingivalis*, *4hbd* de *P. gingivalis* *fimD::sucA* de *M. bovis*, *4hbd* de *C. kluyveri* *rrnC::cscAKB*). Se seleccionaron recombinantes mediante crecimiento con sacarosa y se verificaron mediante PCR

de diagnóstico.

Se transformó ECKh-463 con pZS*13 que contenía Cat2 de *P. gingivalis* y Ald de *C. beijerinckii* para proporcionar una ruta de BDO completa. Se cultivaron las células en medio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 6,78 g/l, KH₂PO₄ 3,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1,0 g/l, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,1 mM) suplementado con sacarosa 10 g/l. Estaba presente IPTG 0,2 mM en el cultivo desde el inicio. Se mantuvieron condiciones anaerobias usando una botella con una aguja de 23G. Como control, se cultivó ECKh-432 que contenía el mismo plásmido en el mismo medio, excepto por glucosa 10 g/l en lugar de sacarosa. La figura 57 muestra la concentración de producto promedio, normalizada con respecto a la DO600 de cultivo, tras 48 horas de crecimiento. Los datos son para 6 cultivos repetidos de cada cepa. Esto demuestra que la producción de BDO a partir de ECKh-463 con sacarosa es similar a la de la cepa original con sacarosa.

EJEMPLO XIX

Sumario de cepas productoras de BDO

Este ejemplo describe diversas cepas productoras de BDO.

La tabla 28 resume diversas cepas productoras de BDO divulgadas anteriormente en los ejemplos XII-XVIII.

Tabla 28. Sumario de diversas cepas de producción de BDO.

N.º de cepa	N.º de cepa huésped	Cromosoma huésped	Descripción del huésped	Basado en plásmido
1		Δ ldhA	Derivado con una única delección de <i>E. coli</i> MG1655	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
2	AB3	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB	Cepa productora de succinato; derivada de <i>E. coli</i> MG1655	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
3	ECKh-138	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322	Mejora de lpdA para aumentar el flujo de piruvato deshidrogenasa	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
4	ECKh-138	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322		sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , buk1 de <i>C. acetobutylicum</i> , ptb de <i>C. acetobutylicum</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
5	ECKh-401	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA	Delecciones en mdh y arcA para dirigir el flujo a través del ciclo de TCA oxidativo	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
6	ECKh-401	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA		sucA de <i>M. bovis</i> , sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
7	ECKh-422	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L	Mutación en citrato sintasa para mejorar la actividad anaerobia	sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
8	ECKh-422	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L		sucA de <i>M. bovis</i> , sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i>
9	ECKh-422	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L		sucA de <i>M. bovis</i> , sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> , Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
10	ECKh-426	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB	Rama de succinato de la ruta aguas	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>

		Δ lpdA:: K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i>	arriba integrada en ECKh-422	
11	ECKh-432	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA:: K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluuyveri</i>	Ramas de succinato y alfa-cetoglutarato de ruta aguas arriba integradas en ECKh- 422	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
12	ECKh-432	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA:: K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluuyveri</i>		buk1 de <i>C. acetobutylicum</i> , ptb de <i>C. acetobutylicum</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
13	ECKh-439	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA:: K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L Δ ackA fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluuyveri</i>	Delección de acetato cinasa de ECKh-432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
14	ECKh-453	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA:: K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L Δ ackA Δ ppc::H.i.ppck fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluuyveri</i>	Delección de acetato cinasa y sustitución PPC/PEPCK de ECKh-432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
15	ECKh-456	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::fnr-pflB6- K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluuyveri</i>	Sustitución de promotor lpdA por promotor anaerobio en ECKh-432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
16	ECKh-455	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA:: K.p.lpdA322 Δ pdhR:: fnr-pflB6 Δ mdh Δ arcA gltAR163L fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> ,	Sustitución de pdhR y promotor aceEF por promotor anaerobio en ECKh- 432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>

		sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluveri</i>		
17	ECKh-459	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA:: K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluveri</i> fimD:: buk1 de <i>C. acetobutylicum</i> , ptb de <i>C. acetobutylicum</i>	Integración de BK/PTB en ECKh-432	Ald de <i>C. beijerinckii</i>
18	ECKh-459	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA:: K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluveri</i> fimD:: buk1 de <i>C. acetobutylicum</i> , ptb de <i>C. acetobutylicum</i>		Ald de <i>C. beijerinckii</i> , adh1 de <i>G. thermoglucosidasius</i>
19	ECKh-463	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA:: K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluveri</i> rrnC:: cscAKB	Genes de sacarosa distintos de PTS insertados en ECKh-432	Cat2 de <i>P. gingivalis</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>
20	ECKh-463	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA:: K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ gltAR163L fimD:: sucCD de <i>E. coli</i> , sucD de <i>P. gingivalis</i> , 4hbd de <i>P. gingivalis</i> fimD:: sucA de <i>M. bovis</i> , 4hbd de <i>C. kluveri</i> rrnC::cscAKB		buk1 de <i>C. acetobutylicum</i> , ptb de <i>C. acetobutylicum</i> , Ald de <i>C. beijerinckii</i>

Las cepas resumidas en la tabla 28 son las siguientes.

5 Cepa 1: Derivado con una única delección de *E. coli* MG1655, con delección de *ldhA* endógeno; expresión en plásmido de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, Cat2 de *P. gingivalis*, AdhE2 de *C. acetobutylicum*.

10 Cepa 2: Cepa huésped AB3, una cepa productora de succinato, derivada de *E. coli* MG1655, con delecciones de *adhE* *ldhA* *pflB* endógenos; expresión en plásmido de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, Cat2 de *P. gingivalis*, AdhE2 de *C. acetobutylicum*.

Cepa 3: Cepa huésped ECKh-138, delección de *adhE*, *ldhA*, *pflB* endógenos, delección *lpdA* endógeno e inserción cromosómica de *lpdA* de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus *lpdA*; expresión en

plásmido de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, Cat2 de *P. gingivalis*, AdhE2 de *C. acetobutylicum*; la cepa proporciona mejora de lpdA para aumentar el flujo de piruvato deshidrogenasa.

5 Cepa 4: Cepa huésped ECKh-138, delección de adhE, ldhA, pflB y lpdA endógenos, inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys; expresión en plásmido de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, buk1 de *C. acetobutylicum*, ptb de *C. acetobutylicum*, AdhE2 de *C. acetobutylicum*.

10 Cepa 5: Cepa huésped ECKh-401, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos; expresión en plásmido de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, Cat2 de *P. gingivalis*, AdhE2 de *C. acetobutylicum*; la cepa tiene delecciones en mdh y arcA para dirigir el flujo a través del ciclo de TCA oxidativo.

15 Cepa 6: cepa huésped ECKh-401, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos; expresión en plásmido de sucA de *M. bovis*, sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, Cat2 de *P. gingivalis*, AdhE2 de *C. acetobutylicum*.

20 Cepa 7: Cepa huésped ECKh-422, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA; expresión en plásmido de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, Cat2 de *P. gingivalis*, AdhE2 de *C. acetobutylicum*; la cepa tiene mutación en citrato sintasa para mejorar la actividad anaerobia.

25 Cepa 8: cepa ECKh-422, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA; expresión en plásmido de sucA de *M. bovis*, sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, Cat2 de *P. gingivalis*, AdhE2 de *C. acetobutylicum*.

30 Cepa 9: cepa huésped ECKh-422, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA; expresión en plásmido de sucA de *M. bovis*, sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*.

35 Cepa 10: cepa huésped ECKh-426, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*; expresión en plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene la rama de succinato de la ruta aguas arriba integrada en la cepa ECKh-422 en el locus fimD.

45 Cepa 11: cepa huésped ECKh-432, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*; expresión en plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene las ramas succinato y alfa-cetoglutarato de la ruta aguas arriba integradas en ECKh-422.

50 Cepa 12: cepa huésped ECKh-432, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*; expresión en plásmido de buk1 de *C. acetobutylicum*, ptb de *C. acetobutylicum*, Ald de *C. beijerinckii*.

60 Cepa 13: cepa huésped ECKh-439, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de *Klebsiella pneumoniae lpdA* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, delección de ackA endógeno, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*; expresión en plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene delección de acetato cinasa en la cepa ECKh-432.

65 Cepa 14: cepa huésped ECKh-453, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y

arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, delección de ackA endógeno, delección de ppc endógeno e inserción de ppck de *Haemophilus influenza* en el locus ppc, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*; expresión en plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene delección de acetato cinasa y sustitución de PPC/PEPCK en la cepa ECKh-432.

Cepa 15: cepa huésped ECKh-456, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*, sustitución de promotor lpdA por sitio de unión a fnr, promotor pflB-p6 y RBS de pflB; expresión en plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene sustitución de promotor lpdA por promotor anaerobio en la cepa ECKh-432.

Cepa 16: cepa huésped ECKh-455, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*, sustitución de promotor pdhR y aceEF por sitio de unión a fnr, promotor pflB-p6 y RBS de pflB; expresión en plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene sustitución de promotor pdhR y aceEF por promotor anaerobio en ECKh-432.

Cepa 17: cepa huésped ECKh-459, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*, inserción cromosómica en el locus fimD de buk1 de *C. acetobutylicum*, ptb de *C. acetobutylicum*; expresión en plásmido de Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene integración de BK/PTB en la cepa ECKh-432.

Cepa 18: cepa huésped ECKh-459, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*, inserción cromosómica en el locus fimD de buk1 de *C. acetobutylicum*, ptb de *C. acetobutylicum*; expresión en plásmido de Ald de *C. beijerinckii*, adh1 de *G. thermoglucosidasius*.

Cepa 19: cepa huésped ECKh-463, delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*, inserción en el locus rrnC de genes de operón de sacarosa distintos de PTS, sacarosa permeasa (cscB), D-fructocinasa (cscK), sacarosa hidrolasa (cscA) y un represor específico de sacarosa relacionado con LacI (cscR); expresión en plásmido de Cat2 de *P. gingivalis*, Ald de *C. beijerinckii*; la cepa tiene genes de sacarosa distintos de PTS insertados en la cepa ECKh-432.

Cepa 20: cepa huésped ECKh-463 delección de adhE, ldhA, pflB endógenos, delección de lpdA endógeno e inserción cromosómica de lpdA de *Klebsiella pneumoniae* con una mutación Glu354Lys en el locus lpdA, delección de mdh y arcA endógenos, sustitución cromosómica de gltA por mutante Arg163Leu de gltA, inserción cromosómica en el locus fimD de sucCD de *E. coli*, sucD de *P. gingivalis*, 4hbd de *P. gingivalis*, inserción cromosómica en el locus fimD de sucA de *M. bovis*, 4hbd de *C. kluyveri*, inserción en el locus rrnC de operón de sacarosa distinto de PTS; expresión en plásmido de buk1 de *C. acetobutylicum*, ptb de *C. acetobutylicum*, Ald de *C. beijerinckii*.

Además de las cepas productoras de BDO divulgadas en el presente documento, incluyendo aquellas divulgadas en la tabla 28, se entiende que pueden incorporarse modificaciones adicionales que aumentan adicionalmente la producción de BDO y/o disminuyen los subproductos no deseados. Por ejemplo, una cepa productora de BDO, o una cepa de la tabla 28, puede incorporar desactivaciones adicionales para aumentar adicionalmente la producción de BDO o disminuir un subproducto no deseado. Anteriormente se han descrito desactivaciones a modo de ejemplo (véase la publicación estadounidense 2009/0047719). Tales cepas con desactivaciones incluyen, pero no se limitan a, ADHER, NADH6; ADHER, PPCK; ADHER, SUCD4; ADHER, ATPS4r; ADHER, FUM; ADHER, MDH; ADHER, PFLi, PPCK; ADHER, PFLi, SUCD4; ADHER, ACKr, NADH6; ADHER, NADH6, PFLi; ADHER, ASPT, MDH; ADHER, NADH6, PPCK; ADHER, PPCK, THD2; ADHER, ATPS4r, PPCK; ADHER, MDH, THD2; ADHER, FUM, PFLi; ADHER, PPCK, SUCD4; ADHER, GLCpts, PPCK; ADHER, GLUDy, MDH; ADHER, GLUDy, PPCK; ADHER, FUM, PPCK; ADHER, MDH, PPCK; ADHER, FUM, GLUDy; ADHER, FUM, HEX1; ADHER, HEX1, PFLi; ADHER, HEX1, THD2; ADHER, FRD2, LDH_D, MDH; ADHER, FRD2, LDH_D, ME2; ADHER, MDH, PGL, THD2; ADHER, G6PDHy, MDH, THD2; ADHER, PFLi, PPCK, THD2; ADHER, ACKr, AKGD, ATPS4r; ADHER, GLCpts, PFLi, PPCK; ADHER, ACKr, ATPS4r, SUCOAS;

ADHEr, GLUDy, PFLi, PPCK; ADHEr, ME2, PFLi, SUCD4; ADHEr, GLUDy, PFLi, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4; ADHEr, FUM, HEX1, PFLi; ADHEr, MDH, NADH6, THD2; ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6; ADHEr, ATPS4r, FUM, NADH6; ADHEr, ASPT, MDH, NADH6; ADHEr, ASPT, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, GLUDy, MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PPCK; ADHEr, ATPS4r, FUM, PPCK; ADHEr, ASPT, GLCpts, MDH; ADHEr, ASPT, GLUDy, MDH; ADHEr, ME2, SUCD4, THD2; ADHEr, FUM, PPCK, THD2; ADHEr, MDH, PPCK, THD2; ADHEr, GLUDy, MDH, THD2; ADHEr, HEX1, PFLi, THD2; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL; ADHEr, ACKr, FRD2, LDH_D; ADHEr, ACKr, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, FUM, GLUDy; ADHEr, ATPS4r, FUM, HEX1; ADHEr, ATPS4r, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGDH; ADHEr, GLCpts, PPCK, THD2; ADHEr, GLUDy, PPCK, THD2; ADHEr, FUM, HEX1, THD2; ADHEr, ATPS4r, ME2, THD2; ADHEr, FUM, ME2, THD2; ADHEr, GLCpts, GLUDy, PPCK; ADHEr, ME2, PGL, THD2; ADHEr, G6PDHy, ME2, THD2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, ME2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, MDH; ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PFLi; ADHEr, ATPS4r, MDH, NADH6, PGL; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, NADH6; ADHEr, ACKr, FUM, GLUDy, LDH_D; ADHEr, ACKr, GLUDy, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL, THD2; ADHEr, ASPT, G6PDHy, MDH, PYK; ADHEr, ASPT, MDH, PGL, PYK; ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, SUCOAS; ADHEr, ASPT, FUM, LDH_D, MDH; ADHEr, ASPT, LDH_D, MALS, MDH; ADHEr, ASPT, ICL, LDH_D, MDH; ADHEr, FRD2, GLUDy, LDH_D, PPCK; ADHEr, FRD2, LDH_D, PPCK, THD2; ADHEr, ACKr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ACKr, ACS, PPC, PPCK; ADHEr, GLUDy, LDH_D, PPC, PPCK; ADHEr, LDH_D, PPC, PPCK, THD2; ADHEr, ASPT, ATPS4r, GLCpts, MDH; ADHEr, G6PDHy, MDH, NADH6, THD2; ADHEr, MDH, NADH6, PGL, THD2; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, GLCpts, MDH; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, MDH, PGL; ADHEr, ACKr, LDH_D, MDH, SUCD4.

La tabla 29 muestra las reacciones de genes correspondientes que van a desactivarse de un organismo huésped tal como *E. coli*. En la tabla 30 se muestra el metabolito correspondiente que corresponde a las abreviaturas en la tabla 29.

Tabla 29. Genes correspondientes que van a desactivarse para impedir que se produzca una reacción particular en *E. coli*.

Abreviatura de reacción	Estequiometría de reacción*	Genes que codifican para la(s) enzima(s) que cataliza(n) cada reacción&
ACKr	[c] : ac + atp <=> actp + adp	(b3115 o b2296 o b1849)
ACS	[c] : ac + atp + coa --> accoa + amp + ppi	b4069
ACt6	ac[p] + h[p] <=> ac[c] + h[c]	Ningún gen asociado
ADHEr	[c] : etoh + nad <=> acald + h + nadh [c] : acald + coa + nad <=> accoa + h + nadh	(b0356 o b1478 o b1241) (b1241 o b0351)
AKGD	[c] : akg + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	(b0116 y b0726 y b0727)
ASNS2	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139
ATPS4r	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <=> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735)) o ((b3736 y b3737 y b3738) y (b3731 y b3732 y b3733 y b3734 y b3735) y b3739))
CBMK2	[c] : atp + co2 + nh4 <=> adp + cbp + (2) h	(b0521 o b0323 o b2874)
EDA	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850
ENO	[c] : 2pg <=> h2o + pep	b2779
FBA	[c] : fdp <=> dhap + g3p	(b2097 o b2925 o b1773)
FBP	[c] : fdp + h2o --> f6p + pi	(b4232 o b3925)
FDH2	for[p] + (2) h[c] + q8[c] --> co2[c] + h[p] + q8h2[c] for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] --> co2[c] + h[p] + mq18[c]	((b3892 y b3893 y b3894) o (b1474 y b1475 y b1476))
FRD2	[c] : fum + mql8 --> mqn8 + succ [c] : 2dmmq18 + fum --> 2dmmq8 + succ	(b4151 y b4152 y b4153 y b4154)
FTHFD	[c] : 10fthf + h2o --> for + h + thf	b1232
FUM	[c] : fum + h2o <=> mal-L	(b1612 o b4122 o b1611)
G5SD	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	[c] : g6p + nadp <=> 6pgl + h + nadph	b1852
GLCpts	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 y b1101 y b2415 y b2416) o (b1817 y b1818 y b1819 y b2415 y b2416) o (b2417 y b1621 y b2415 y b2416))
GLU5K	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	[c] : glu-L + h2o + nadp <=> akg + h + nadph + nh4	b1761
GLYCL	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 y b2903 y b2905 y b0116)
HEX1	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388

ICL	[c] : icit --> glx + succ	b4015
LDH_D	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	(b2133 o b1380)
MALS	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014 o b2976)
MDH	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236
ME2	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
MTHFC	[c] : h2o + methf <==> 10fthf + h	b0529
NADH12	[c] : h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad [c] : h + nadh + q8 --> nad + q8h2 [c] : 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmq18 + nad	b1109
NADH6	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c] (4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c] 2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmq18[c] + (3) h[p] + nad[c]	(b2276 y b2277 y b2278 y b2279 y b2280 y b2281 y b2282 y b2283 y b2284 y b2285 y b2286 y b2287 y b2288)
PFK	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916 o b1723)
PFLi	[c] : coa + pyr --> accoa + for	((b0902 y b0903) y b2579) o (b0902 y b0903) o (b0902 y b3114) o (b3951 y b3952))
PGDH	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGI	[c] : g6p <==> f6p	b4025
PGL	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	[c] : 2pg <==> 3pg	(b3612 o b4395 o b0755)
PPC	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
PPCK	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PROlz	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fADH2 + h	b1014
PYK	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	(b1854 o b1676)
PYRt2	h[p] + pyr[p] <==> h[c] + pyr[c]	Ningún gen asociado
RPE	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301 o b3386)
SO4t2	so4[e] <==> so4[p]	(b0241 o b0929 o b1377 o b2215)
SUCD4	[c] : q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 y b0722 y b0723 y b0724)
SUCOAS	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 y b0729)
SULabc	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 y b2425 y b2424 y b2423) o (b0763 y b0764 y b0765) o (b2422 y b2424 y b2423 y b3917))
TAL	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464 o b0008)
THD2	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 y b1603)
THD5	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962 o (b1602 y b1603))
TPI	[c] : dhap <==> g3p	b3919

Tabla 30. Nombres de metabolitos correspondientes a las abreviaturas usadas en la tabla 29.

Abreviatura de metabolito	Nombre de metabolito
10fthf	10-Formiltetrahidrofolato
1pyr5c	1-Pirrolin-5-carboxilato
2ddg6p	2-Deshidro-3-deoxi-D-gluconato 6-fosfato
2dmmq8	2-Demetilmenaquinona 8
2dmmq18	2-Demetilmenaquinol 8
2pg	D-Glicerato 2-fosfato
3pg	3-Fosfo-D-glicerato
6pgc	6-Fosfo-D-gluconato
6pgl	6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona
ac	Acetato
acald	Acetaldehído
accoa	Acetil-CoA
actp	Fosfato de acetilo
adp	ADP
akg	2-Oxoglutarato
amp	AMP
asn-L	L-Asparagina
asp-L	L-Aspartato
atp	ATP

cbp	Fosfato de carbamoilo
co2	CO ₂
coa	Coenzima A
dhap	Fosfato de dihidroxiacetona
e4p	4-Fosfato de D-eritrosa
etoh	Etanol
f6p	6-Fosfato de D-fructosa
fad	Dinucleótido de flavina y adenina oxidado
fADH2	Dinucleótido de flavina y adenina reducido
fdp	1,6-Bisfosfato de D-fructosa
for	Formiato
fum	Fumarato
g3p	3-Fosfato de gliceraldehído
g6p	6-Fosfato de D-glucosa
glc-D	D-Glucosa
glu5p	L-Glutamato 5-fosfato
glu5sa	L-Glutamato 5-semialdehído
glu-L	L-Glutamato
glx	Glioxilato
gly	Glicina
h	H ⁺
h2o	H ₂ O
icit	Isocitrato
lac-D	D-Lactato
mal-L	L-Malato
methf	5,10-Meteniltetrahidrofolato
mlthf	5,10-Metilenotetrahidrofolato
mql8	Menaquinol 8
mqn8	Menaquinona 8
nad	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
nadh	Dinucleótido de nicotinamida y adenina - reducido
nadp	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina
nadph	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina – reducido
nh4	Amonio
oaa	Oxaloacetato
pep	Fosfoenolpiruvato
pi	Fosfato
ppi	Difosfato
pro-L	L-Prolina
pyr	Piruvato
q8	Ubiquinona-8
q8h2	Ubiquinol-8
ru5p-D	5-Fosfato de D-ribulosa
s7p	7-Fosfato de sedoheptulosa
so4	Sulfato
succ	Succinato
succoa	Succinil-CoA
thf	5,6,7,8-Tetrahidrofolato
xu5p-D	5-Fosfato de D-xilulosa

REIVINDICACIONES

1. Organismo microbiano que no se produce de manera natural, que tiene una ruta de 1,4-butanodiol (BDO) que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica para una enzima de la ruta de BDO expresada en una cantidad suficiente para producir BDO, en el que dicho organismo microbiano está modificado genéticamente para expresar 4-hidroxibutiril-CoA reductasa exógena, y en el que dicho organismo microbiano comprende:
A) una ruta de BDO que comprende:
(a) alfa-cetoglutarato descarboxilasa; o
succinil-CoA sintetasa y succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA; o
alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA; o
glutamato:succinato semialdehído transaminasa y glutamato descarboxilasa;
(b) 4-hidroxibutirato deshidrogenasa;
(c) 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa, o butirato cinasa y fosfotransbutirilasa; y
(d) 4-hidroxibutiril-CoA reductasa y 4-hidroxibutanol reductasa; y
(B) en el que dicho organismo microbiano comprende alteración de un gen que codifica para un sistema regulador del control respiratorio aerobio; expresa una citrato sintasa insensible a NADH exógena; expresa piruvato deshidrogenasa exógena y expresa fosfoenolpiruvato carboxicinas exógena.
2. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que la ruta de BDO comprende:
(a) alfa-cetoglutarato descarboxilasa;
(b) 4-hidroxibutirato deshidrogenasa;
(c) 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa; y
(d) 4-hidroxibutiril-CoA reductasa y 4-hidroxibutanol reductasa.
3. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que la ruta de BDO comprende:
(a) succinil-CoA sintetasa y succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA;
(b) 4-hidroxibutirato deshidrogenasa;
(c) 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa; y
(d) 4-hidroxibutiril-CoA reductasa y 4-hidroxibutanol reductasa.
4. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que la ruta de BDO comprende:
(a) alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA;
(b) 4-hidroxibutirato deshidrogenasa;
(c) 4-hidroxibutiril-CoA/acetil-CoA transferasa; y
(d) 4-hidroxibutiril-CoA reductasa y 4-hidroxibutanol reductasa.
5. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que la ruta de BDO comprende:
(a) glutamato:succinato semialdehído transaminasa y glutamato descarboxilasa;

- (b) 4-hidroxi butirato deshidrogenasa;
- (c) 4-hidroxi butiril-CoA/acetil-CoA transferasa; y
- 5 (d) 4-hidroxi butiril-CoA reductasa y 4-hidroxi butanal reductasa.
6. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que la ruta de BDO comprende:
- 10 (a) alfa-cetoglutarato descarboxilasa;
- (b) 4-hidroxi butirato deshidrogenasa;
- (c) butirato cinasa y fosfotransbutirilasa; y
- 15 (d) 4-hidroxi butiril-CoA reductasa y 4-hidroxi butanal reductasa.
7. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que la ruta de BDO comprende:
- 20 (a) succinil-CoA sintetasa y succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA;
- (b) 4-hidroxi butirato deshidrogenasa;
- 25 (c) butirato cinasa y fosfotransbutirilasa; y
- (d) 4-hidroxi butiril-CoA reductasa y 4-hidroxi butanal reductasa.
8. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que la ruta de BDO comprende:
- 30 (a) alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA;
- (b) 4-hidroxi butirato deshidrogenasa;
- 35 (c) butirato cinasa y fosfotransbutirilasa; y
- (d) 4-hidroxi butiril-CoA reductasa y 4-hidroxi butanal reductasa.
- 40 9. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según la reivindicación 1, en el que la ruta de BDO comprende:
- (a) glutamato:succinato semialdehído transaminasa y glutamato descarboxilasa;
- 45 (b) 4-hidroxi butirato deshidrogenasa;
- (c) butirato cinasa y fosfotransbutirilasa; y
- (d) 4-hidroxi butiril-CoA reductasa y 4-hidroxi butanal reductasa.
- 50 10. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que
- 55 a) la succinil-CoA sintetasa se codifica por los genes sucCD de *Escherichia coli*,
- b) dicha alfa-cetoglutarato descarboxilasa se codifica por el gen sucA de *Mycobacterium bovis*,
- c) la succinato semialdehído deshidrogenasa dependiente de CoA, 4-hidroxi butirato deshidrogenasa y 4-hidroxi butiril-CoA/acetil-CoA transferasa se codifican por genes de *Porphyromonas gingivalis* W83,
- 60 d) la butirato cinasa y fosfotransbutirilasa se codifican por genes buk1 y ptb de *Clostridium acetobutylicum*,
- e) la 4-hidroxi butiril-CoA reductasa se codifica por el gen ald de *Clostridium beijerinckii*,
- 65 f) la 4-hidroxi butanal reductasa se codifica por el gen adh1 de *Geobacillus thermoglucosidasius*,

g) dicha piruvato deshidrogenasa exógena se codifica por el gen *lpdA* de *Klebsiella pneumonia*,

h) dicha citrato sintasa insensible a NADH se codifica por *gltA*,

5 i) dicha citrato sintasa insensible a NADH se codifica por un mutante R163L de *gltA*, o

j) dicha fosfoenolpiruvato carboxicina se codifica por un gen de fosfoenolpiruvato carboxicina de *Haemophilus influenza*.

10 11. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha piruvato deshidrogenasa exógena es insensible a NADH.

12. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que uno o más de los genes de subunidades de piruvato deshidrogenasa de dicho organismo microbiano están bajo el control de un promotor de piruvato-formiato liasa.

13. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la alteración de dicho sistema regulador del control respiratorio anaerobio es la alteración del gen *arcA*.

14. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además la alteración de un gen que codifica para malato deshidrogenasa.

15 15. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que uno o más genes que codifican para dichas enzimas expresadas de manera exógena están integrados en el locus *fimD* del organismo huésped.

16. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho organismo expresa un sistema de captación de sacarosa distinto de fosfotransferasa.

17. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho organismo comprende además la alteración de lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y piruvato-formiato liasa endógenas.

18. Organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el organismo microbiano es *Escherichia coli*.

19. Método para producir 1,4-butanodiol (BDO), que comprende cultivar el organismo microbiano que no se produce de manera natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en condiciones y durante un periodo de tiempo suficientes para producir BDO.

20. Método según la reivindicación 19, que comprende además la etapa de aislar el BDO.

21. Método según la reivindicación 20, en el que el BDO se aísla mediante destilación.

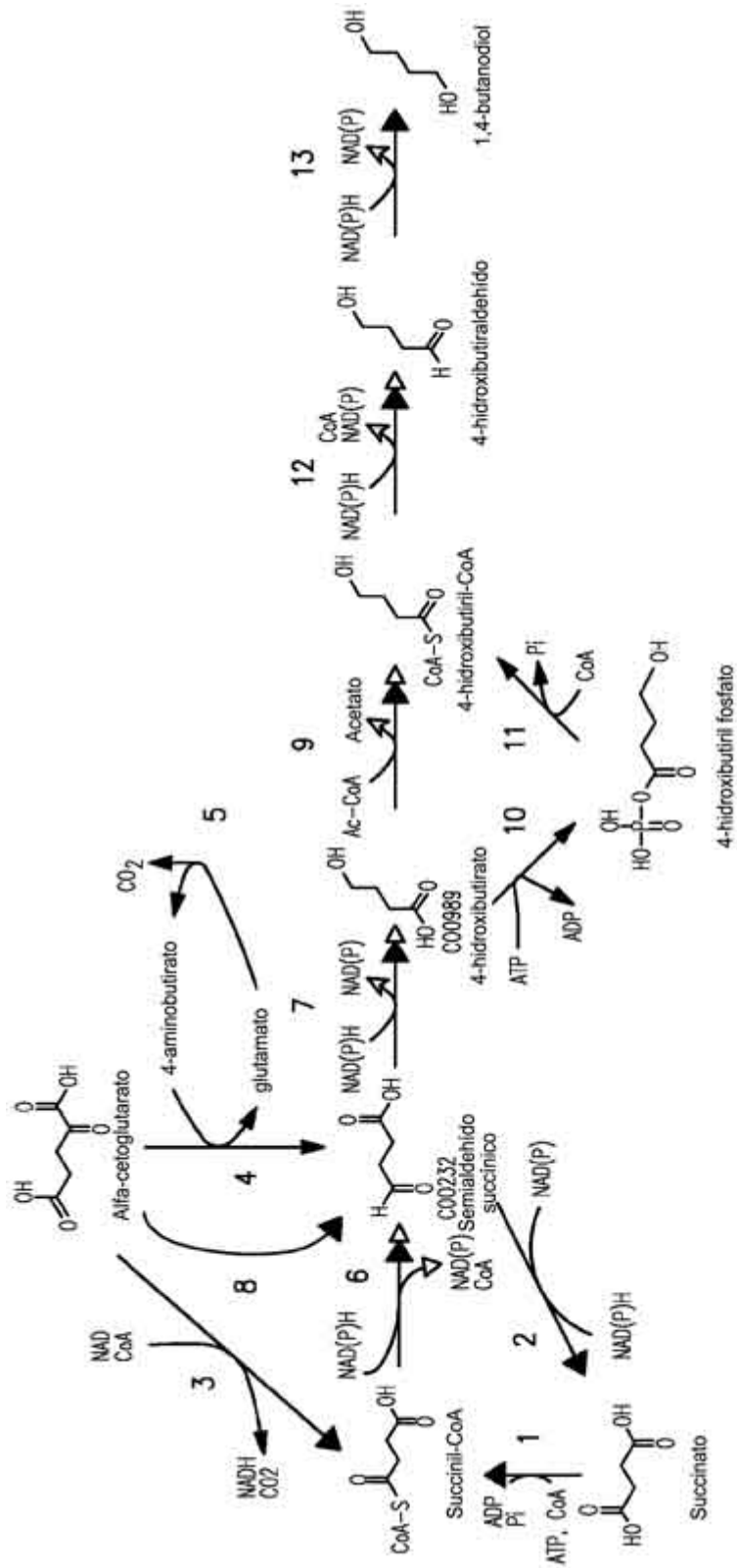


FIG. 1

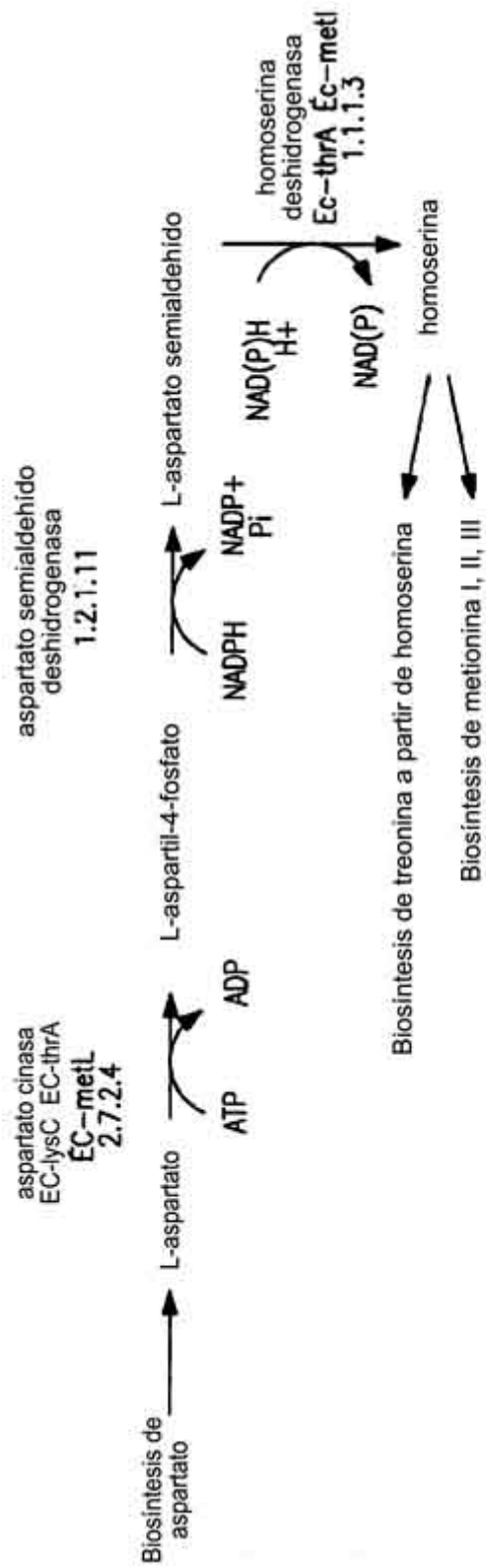


FIGURA 2

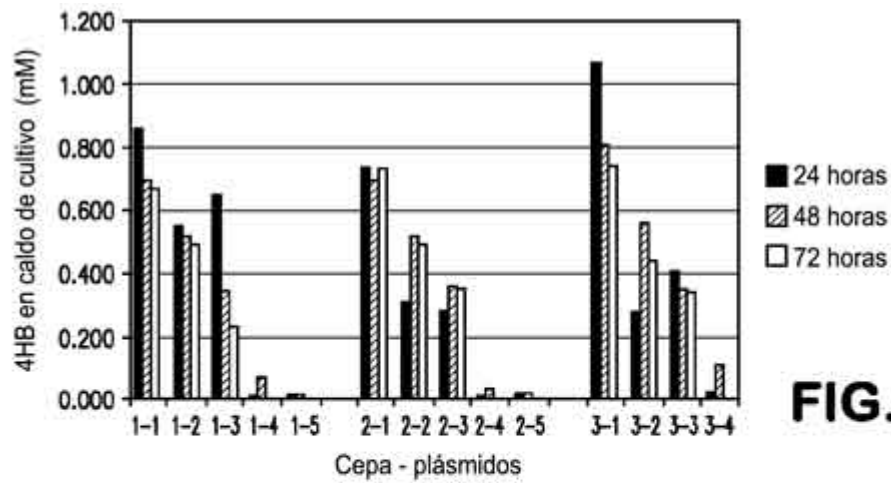


FIG. 3(a)

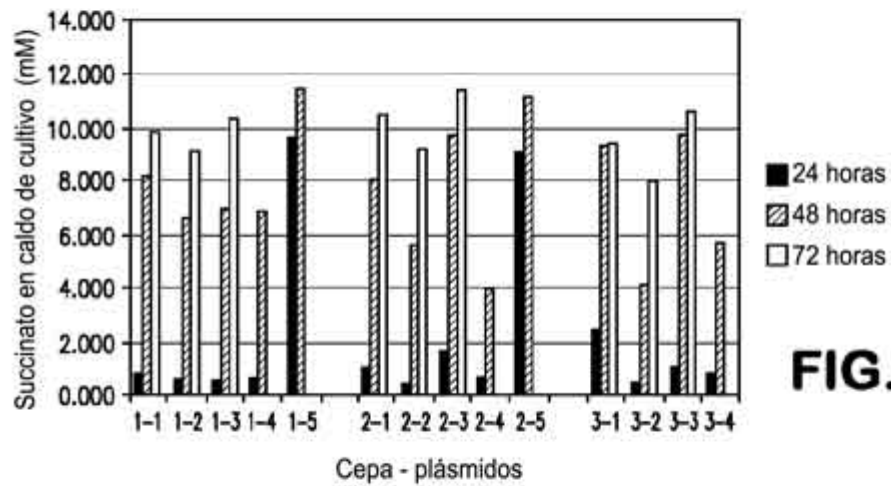


FIG. 3(b)

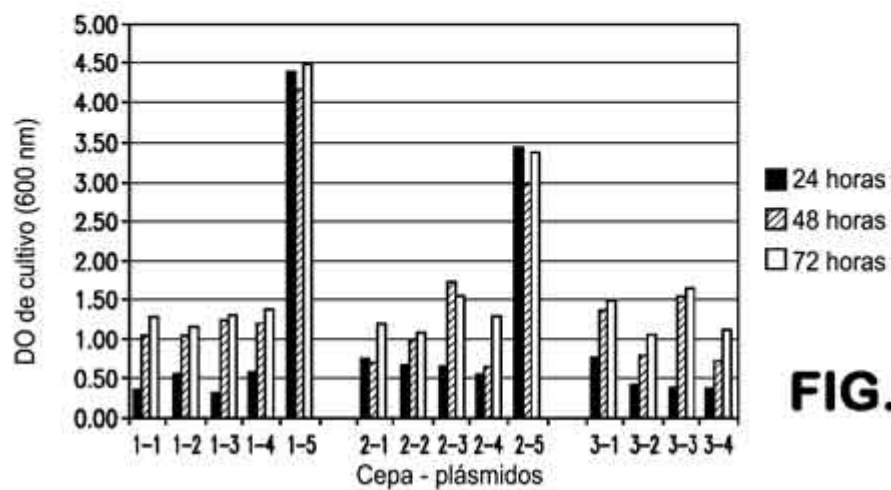


FIG. 3(c)

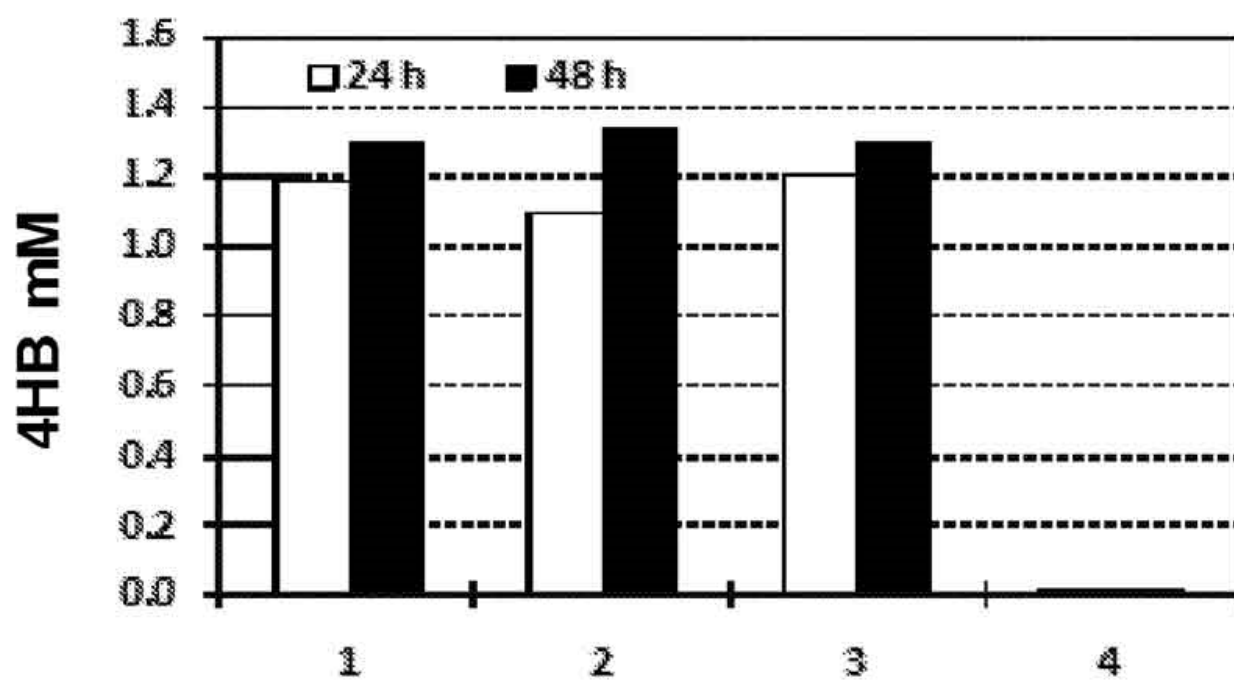
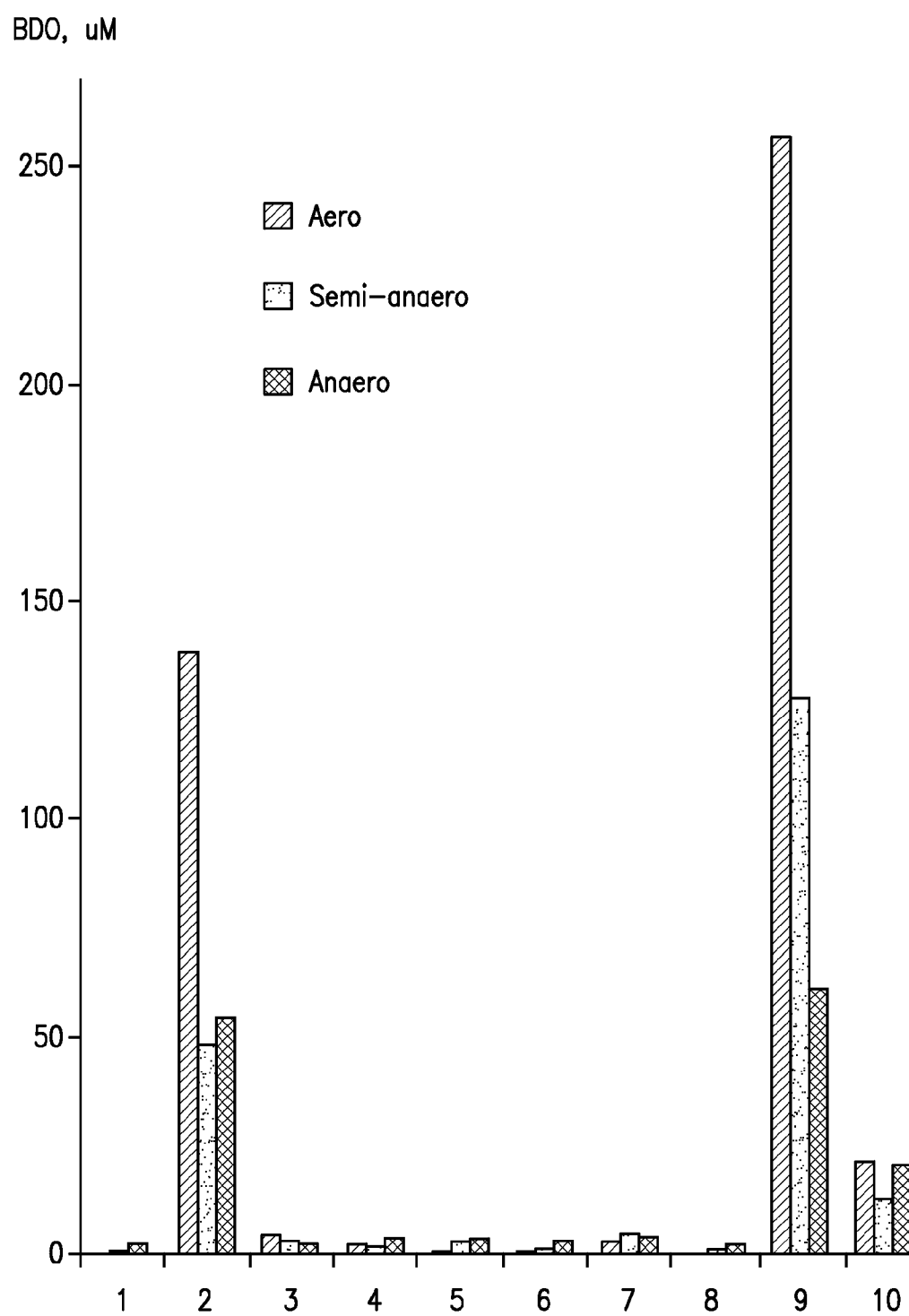


FIGURA 4

**FIG. 5**

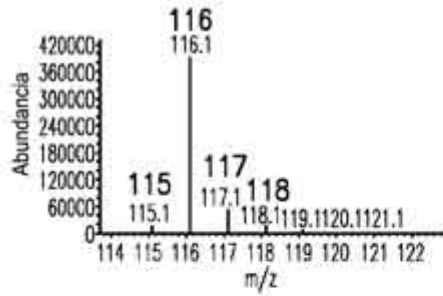


FIG. 6(a)

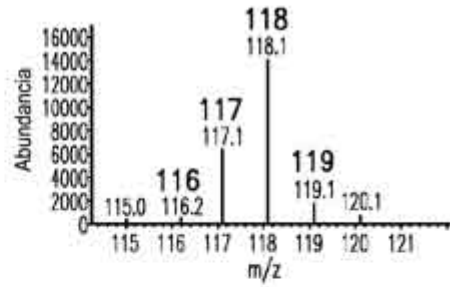


FIG. 6(b)

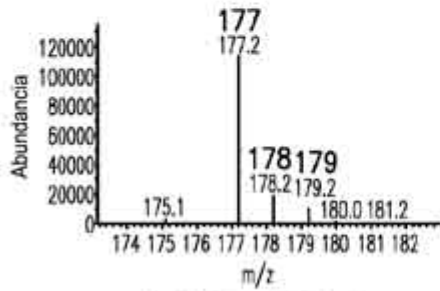


FIG. 6(c)

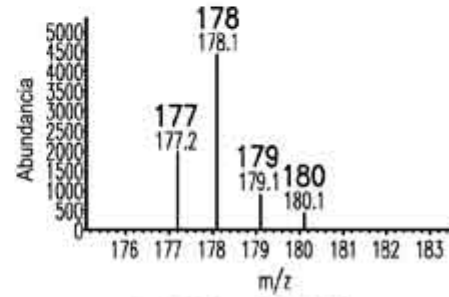


FIG. 6(d)

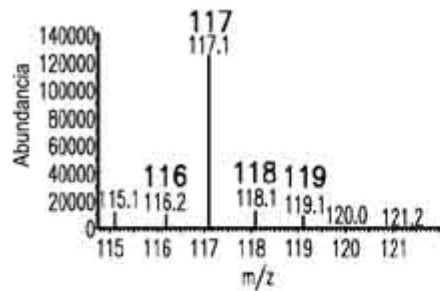


FIG. 6(e)

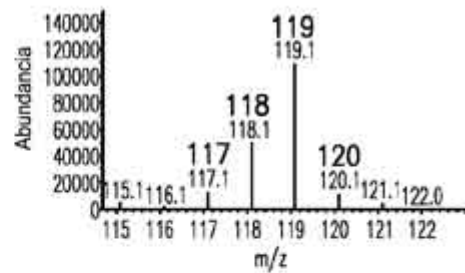


FIG. 6(f)

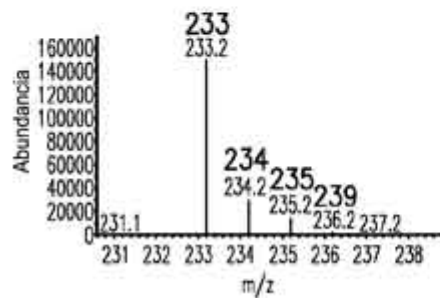


FIG. 6(g)

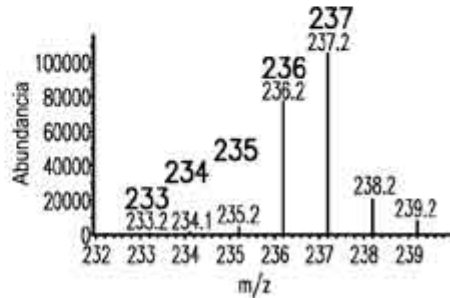


FIG. 6(h)

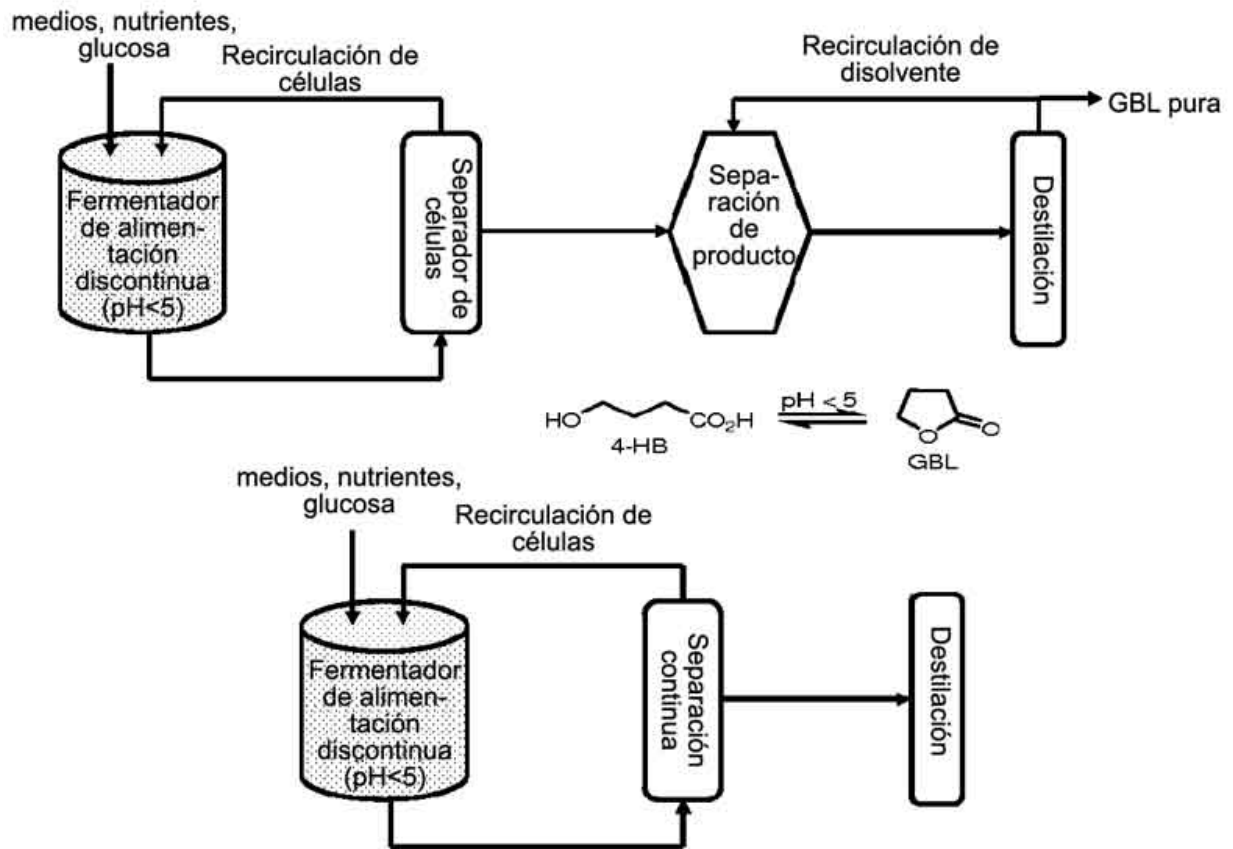


FIGURA 7

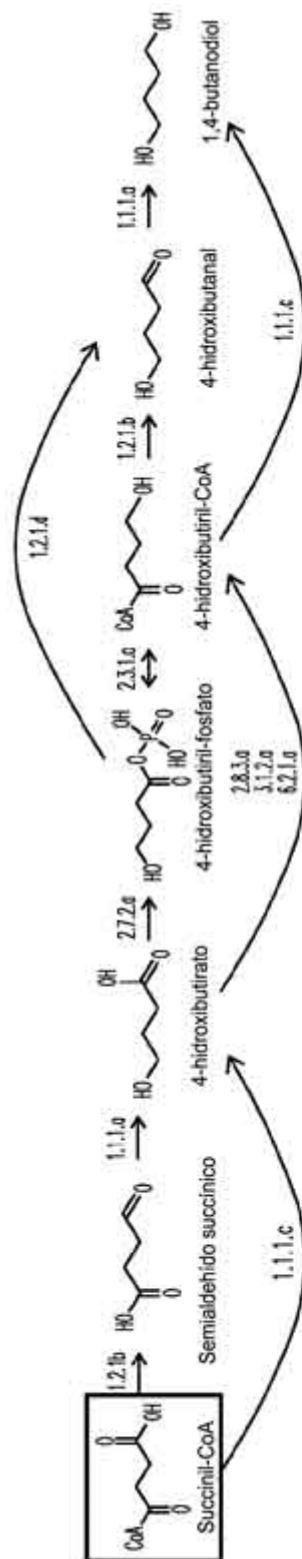


FIG. 8A

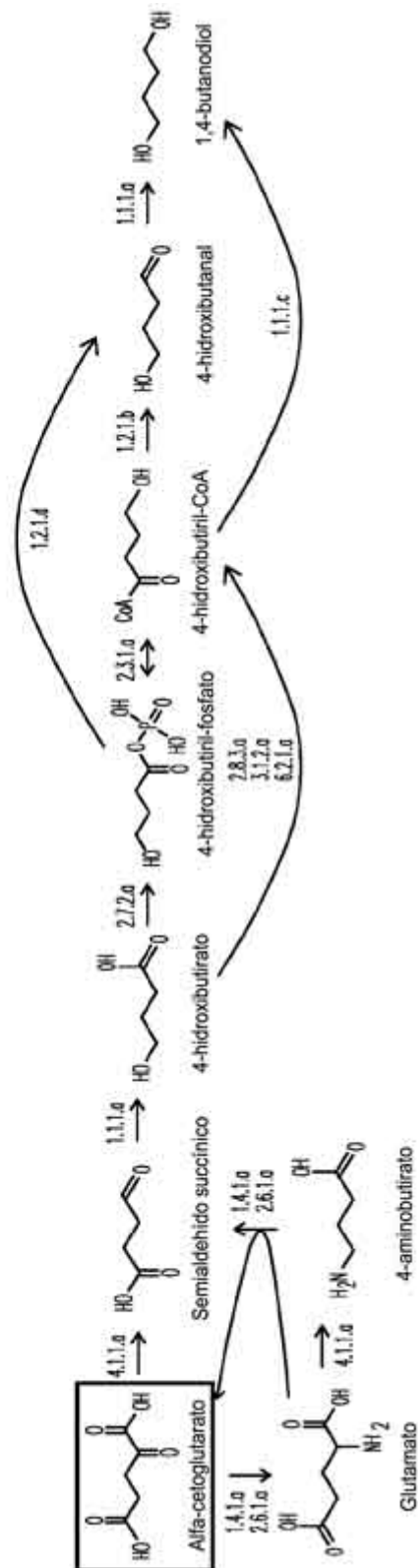


FIG. 8B

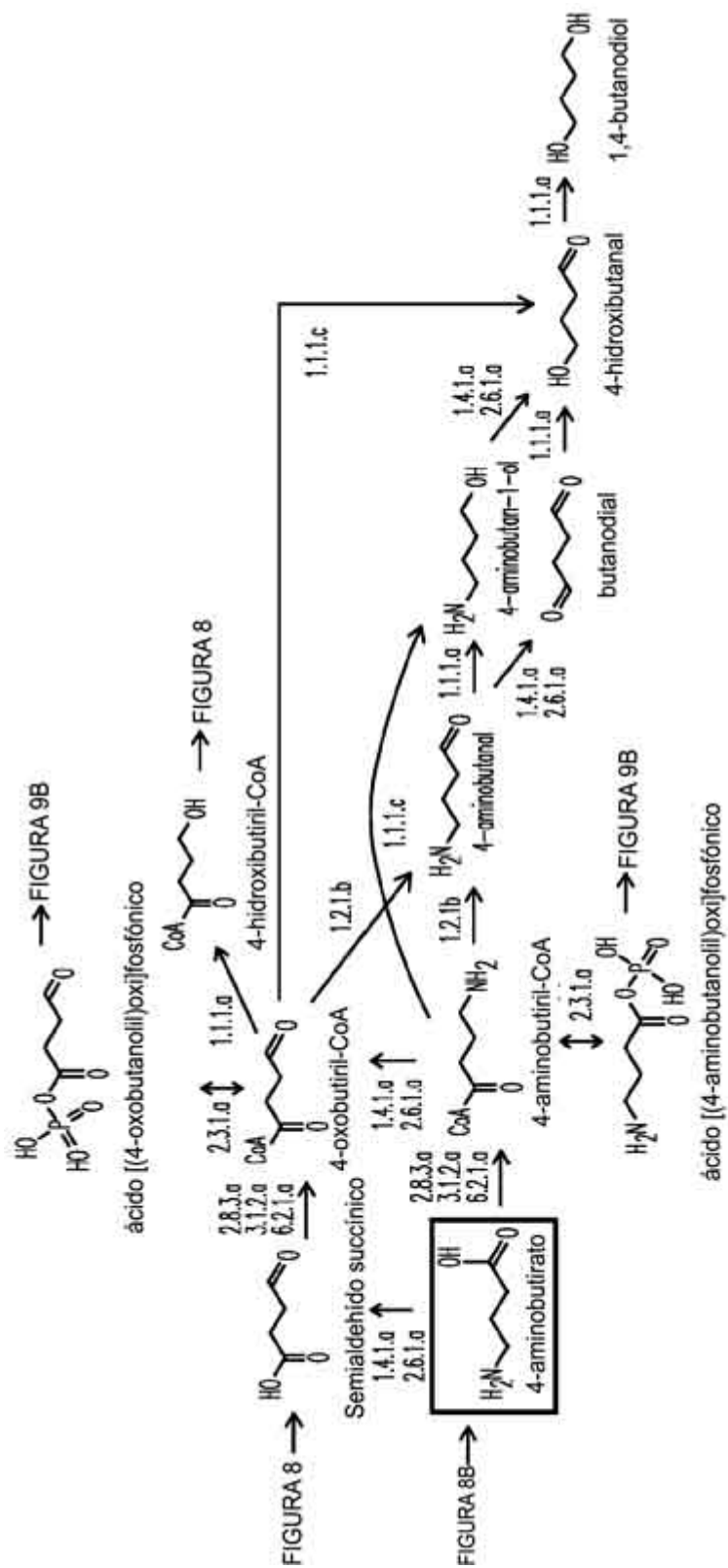


FIG. 9A

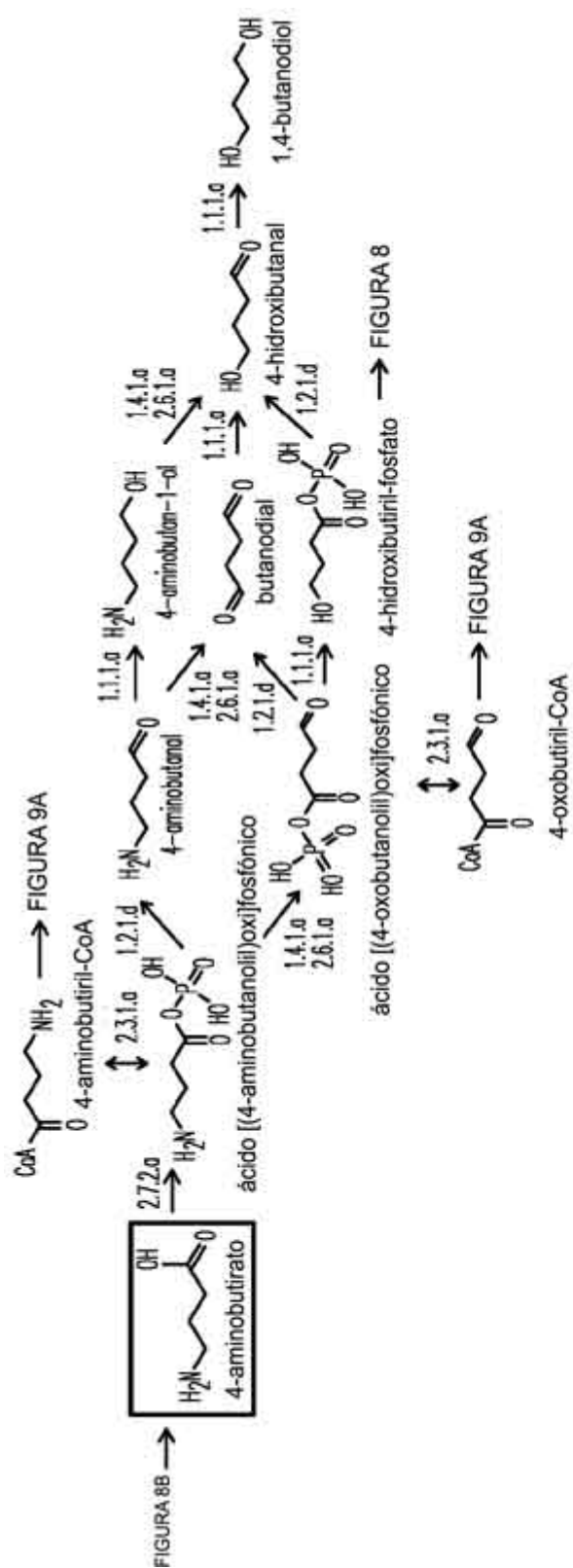


FIG. 9B



FIG. 9C

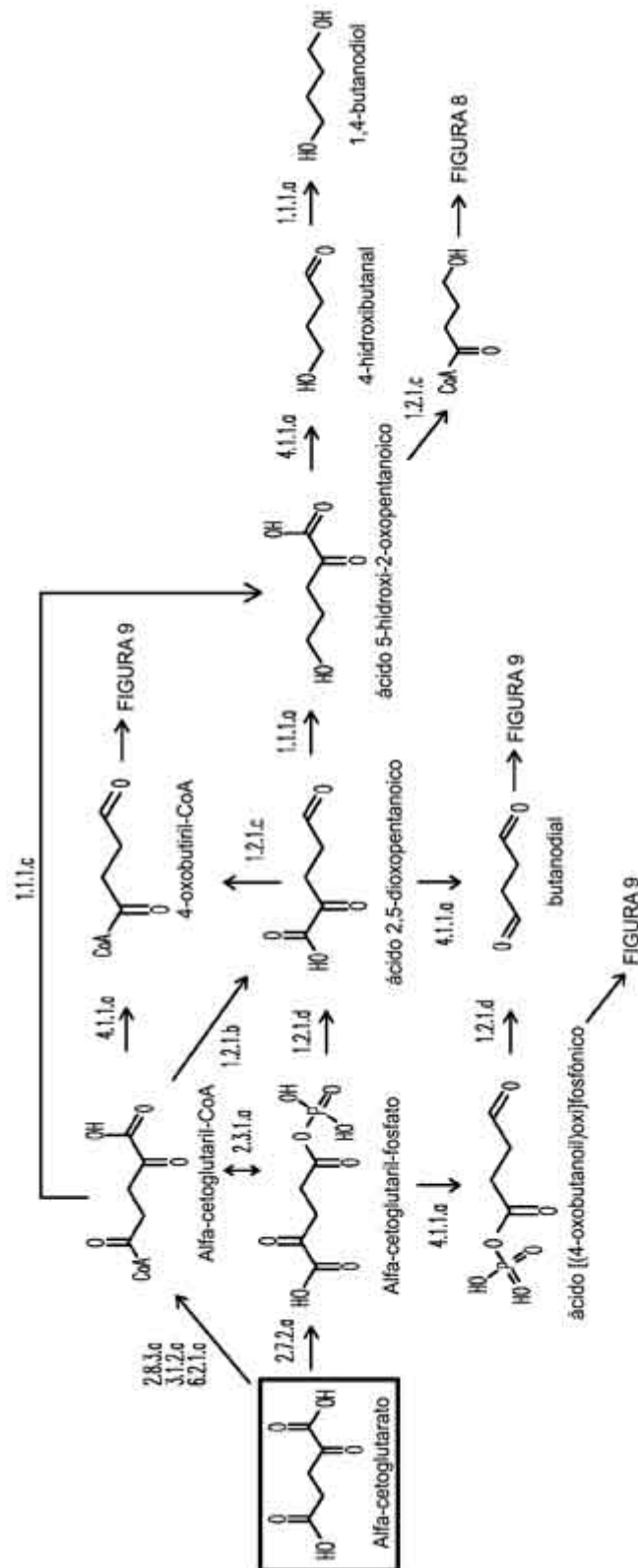


FIG. 10

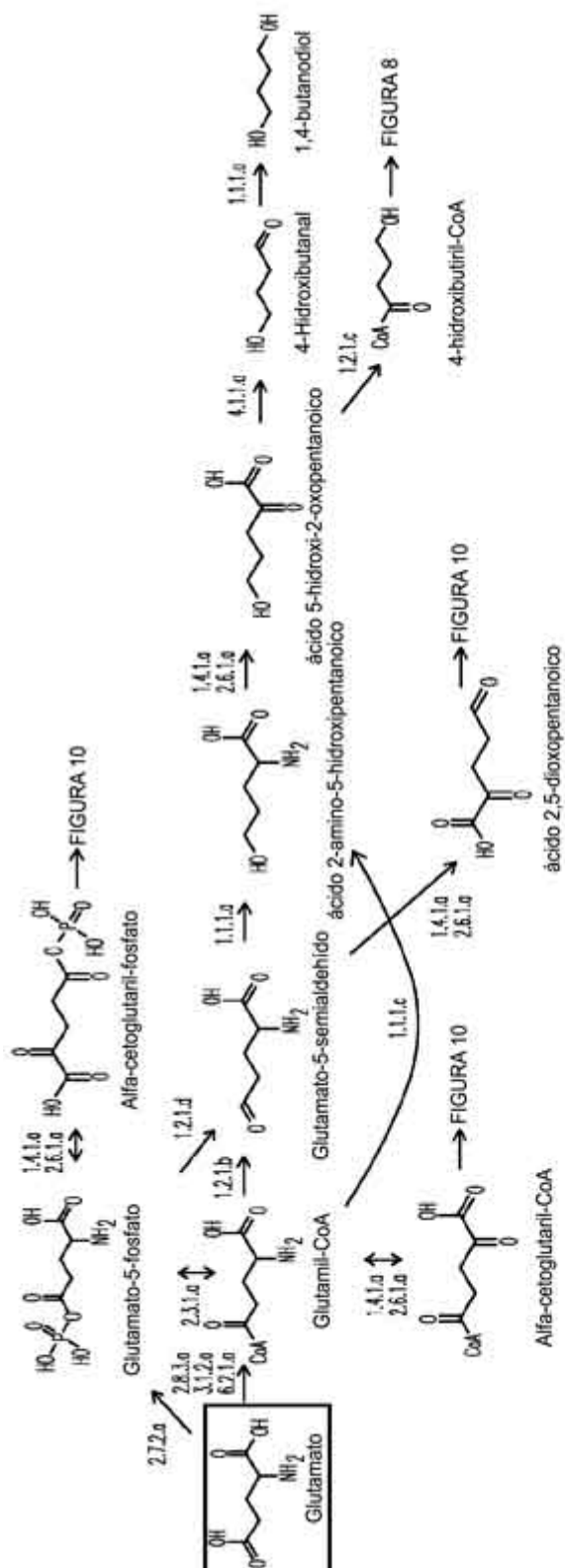


FIG. 11

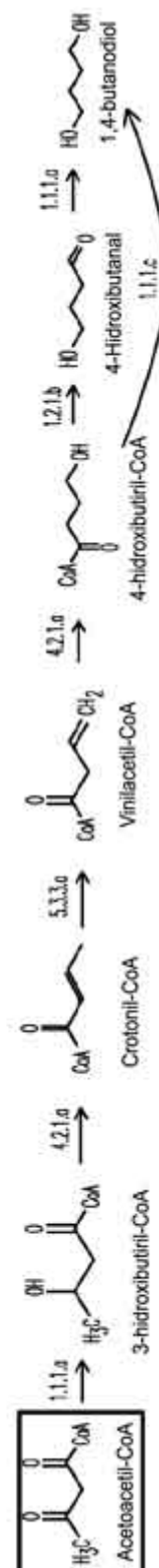


FIG. 12

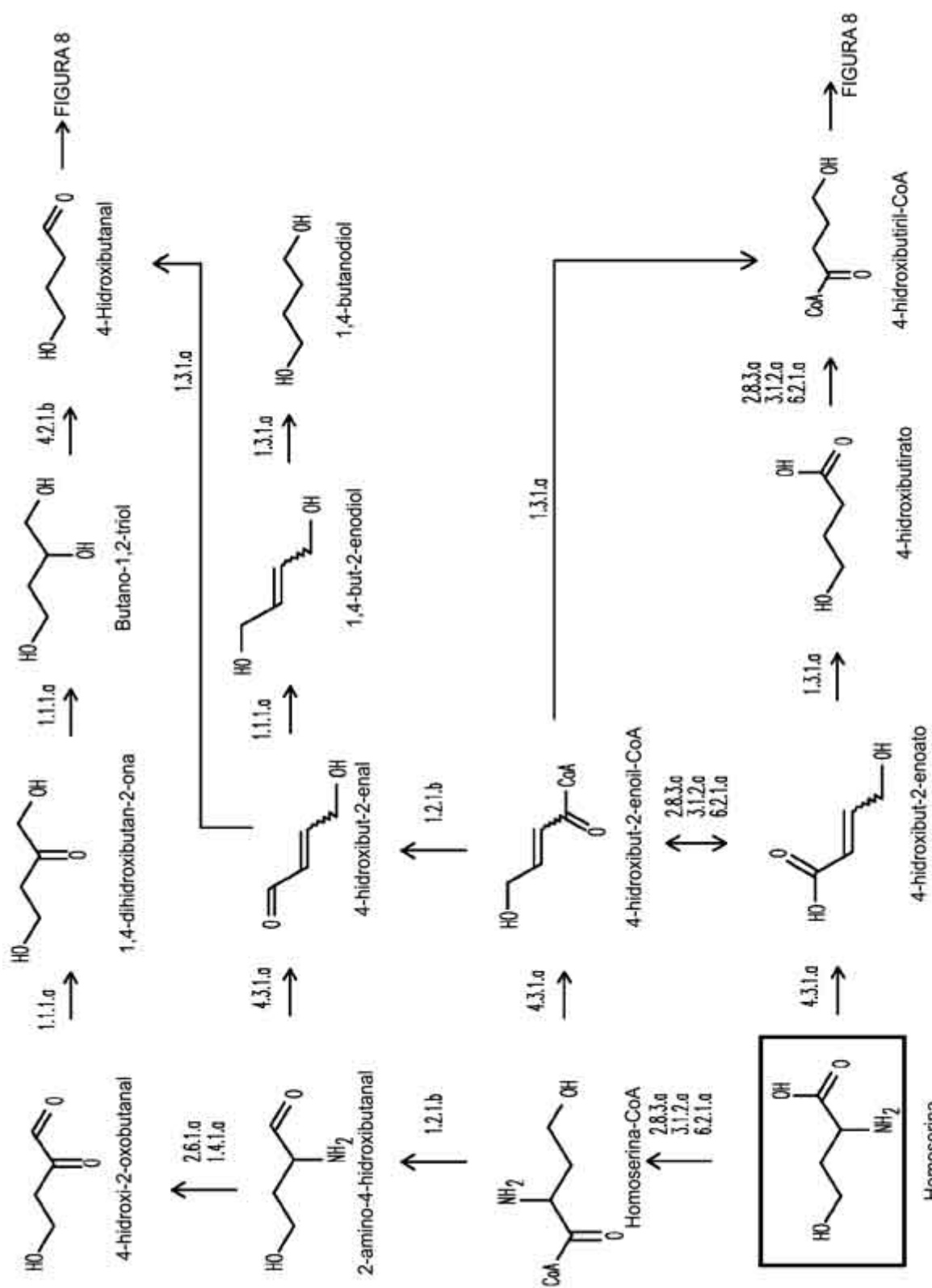


FIG. 13

A.

ATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAACTTTTGCCCGCTATGGCTTACCAGCACCGGTGGGTT
 ATGCCTGTACTACTCCGCGCGAAGCAGAAGAAGCCGCTTCAAAAATCGGTGCCGGTCCGTGGGTAG
 TGAAATGTCAGGTTACGCTGGTGGCCGCGGTAAAGCGGGCGGTGTGAAAGTTGTAAACAGCAAA
 GAAGACATCCGTGCTTTGCAGAAAACCTGGCTGGGCAAGCGTCTGGTAACGTATCAAACAGATGCC
 AATGGCCAACCGGTTAACCAGATTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAAAGAGCTGTATCTCG
 GTGCCGTTGTTGACCGTAGTTCCCGTCGTGTGGTCTTTATGGCCTCCACCGAAGGCGGCGTGAAAT
 CGAAAAAGTGGCGGAAGAACTCCGCACCTGATCCATAAAGTTGCGCTTGATCCGCTGACTGGCCC
 GATGCCGTATCAGGGACGCGAGCTGGCGTTCAAACCTGGGTCTGGAAGGTAAACTGGTTCAGCAGTT
 CACCAAAATCTTCATGGGCCTGGCGACCATTTCTGGAGCGCGACCTGGCGTTGATCGAAATCAAC
 CCGCTGGTCATCAACAAACAGGGCGATCTGATTTGCCCTCGACGGCAAACCTGGGCGCTGACGGCAAC
 GCACTGTTCCGCCAGCCTGATCTGCGCGAAATGCGTGACCAAGTCGAGGAAGATCCGCGTGAAGCA
 CAGGCTGCACAGTGGGAACGAACTACGTTGCGCTGGACGGTAACATCGGTTGATGGTTAACGGC
 GCAGGTCTGGCGATGGGTACGATGGACATCGTTAAACTGCACGGCGGGCAACCGGCTAACTTCCTT
 GACGTTGGCGGCGGCGCAACCAAGAAGCTGTAACCGAAGCGTTCAAAATCATCTCTCTGACGAC
 AAAGTGAAAGCCGTTCTGGTTAACATCTCGGCGGTATCGTTCGTTGCGACCTGATCGCTGACGGTA
 TCATCGGCGCGGTAGCAGAAGTGGGTGTTAACGTACCGGTCGTGGTACGTTGGAAGGTAACAACG
 CCGAACTCGGCGCGAAGAACTGGCTGACAGCGGCCTGAATATTATTGCAGCAAAAGGTCTGACGG
 ATGCAGCTCAGCAGGTTGTTGCCGAGTGGAGGGGAAATAATGTCCATTTAATCGATAAAAAACACC
 AAGGTTATCTGCCAGGGCTTTACCGGTAGCCAGGGGACTTTCCACTCAGAACAGGCCATTGCATACG
 GCACTAAATGGTTGGCGGCGTAACCCAGGTAAAGGCGGCACCAACCCACCTCGGCCTGCCGGTGT
 TCAACACCGTGCGTGAAGCCGTTGCTGCCACTGGCGTACCGCTTCTGTTATCTACGTACCAGCACC
 GTTCTGCAAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGCAGGCATCAAACCTGATTATCACCATCACTGAA
 GGCATCCCGACGCTGGATATGCTGACCGTGAAAGTGAAGCTGGATGAAGCAGGCGTTTCGTATGATC
 GGCCCGAACTGCCAGGCGTTATCACTCCGGGTGAATGCAAAATCGGTATCCAGCCTGGTCACATTC
 ACAAAACGGGTAAAGTGGGTATCGTTTCCCGTTCCGGTACACTGACCTATGAAGCGGTTAAACAGAC
 CACGGATTACGTTTCGGTCAGTCGACCTGTGTCGGTATCGGCGGTGACCCGATCCCGGGCTCTAAC
 TTTATCGACATTCTCGAAATGTTTCGAAAAAGATCCGCAGACCGAAGCGATCGTGATGATCGGTGAGA
 TCGGCGGTAGCGCTGAAGAAGAAGCAGCTGCGTACATCAAAGAGCACGTTACCAAGCCAGTTGTGG
 GTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCCGAAAGGCAAACGTATGGGCCACGCGGTTGCCATCATTGCCG
 GTGGGAAAGGGACTGCGGATGAGAAATTCGCTGCTCTGGAAGCCGAGGCGTGAAAACCGTTTCG
 AGCCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAAACCTGTTCTGAAATAA

B.

MNLHEYQAKQLFARYGLPAPVGYACTTPREAEAAASKIGAGPWVVKQVHAGGRGKAGGVKVVNSKE
 DIRAFAENWLKRLVTYQTDANGQPVNQILVEAATDIAKELYLGAVVDRSSRRVVFMASTEGGVEIEKV
 AEETPHLIHKVALDPLTGPMYPYQGRELAFKLGLEGKLVQQFTKIFMGLATIFLERDLALIEINPLVITKQGD
 ICLDGKLGADGNALFRQPDIREMRDQSQEDPREAQAAQWELNYVALDGNIGCMVNGAGLAMGTMD
 IVKLHGGEPANFLDVGGGATKERVTEAFKIIISDDKVKAFLVNIFGGIVRCDLIADGIIGAVAEGVNVPPV
 VRLEGNAELGAKKLADSGLNIIAAKGLTDAQQVVAAVEGK

C.

MSIUDKNTKVICQGFTGSQGFHSEQAIAYGTMVGGVTPGKGGTTHLGLPVFNTVREAVAATGATAS
 VIYVPAPFCKDSILEAIDAGIKLIITITEGIPTLDMLTVKVKLDEAGVRMIGPNCPGVITPGECKIGIQPGHIHK
 PGKVGIVSRSGTLTYEAVKQTTDYFGQSTCVGIGGDPIPGSNFIDILEMFEKDPQTEAIVMIGEIGGSAEE
 EAAAYIKEHVTKPVVGYIAGVTAPKGRMGHAGAHAGGKGTADKFAALEAAGVKTVRSLADIGEALKT
 VLK

FIGURA 14

A.

ATGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAACGAATGGCTGGTTGAAGAGATGTACCGCAAGTTC
 CGCGACGACCCCTCCTCGGTCGATCCCAGCTGGCACGAGTTCCTGGTTGACTACAGCCCCGAACCCA
 CCTCCAACCAGCTGCCGAACCAACCCGGGTTACCTCGCCACTCGTTGCCGAGCGGGCCGCTGCGGC
 CGCCCCGAGGCACCCCCAAGCCGGCCGACACCGCGGCCGCGGGCAACGGCGTGGTCGCCGCACT
 GGCCGCCAAACTGCCGTTCCCCCGCCAGCCGAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGCGCGGCGCCG
 CCGCGGCCGTCGTAAGAACATGTCCGCGTCGTTGGAGGTGCCGACGGCGACCAGCGTCCGGGCG
 GTCCCGGCCAAGCTACTGATCGACAACCGGATCGTCATCAACAACCAGTTGAAGCGGACCCGCGGC
 GGCAAGATCTCGTTCACGCATTTGCTGGGCTACGCCCTGGTGACGGCGGTGAAGAAATCCCGAAC
 ATGAACCGGCACTACCCGAAGTCGACGGCAAGCCCACCGCGGTACGCCGGCGCACACCAATCTC
 GGCTTGGCGATCGACCTGCAAGGCAAGGACGGGAAGCGTTCCTGGTGGTGGCCGGCATCAAGCG
 GTGCGAGACCATGCGATTGCGCGAGTTCGTACGGCCTACGAAGACATCGTACGCCGGGCCCCGGA
 CGGCAAGCTGACCACTGAAGACTTTGCCGGCGTGACGATTCGCTGACCAATCCCGGAACCATCGGC
 ACCGTGCATTGGTGCCGCGGTGATGCCCGGCCAGGGCGCCATCATCGGCGTGGGCGCCATGGAA
 TACCCCGCCGAGTTTCAAGGCGCCAGCGAGGAACGCATCGCCGAGCTGGGCATCGGCAAATTGATC
 ACTTTGACCTCCACCTACGACCACCGCATCATCCAGGGCGCGGAATCGGGCGACTTCCTGCGCACCA
 TCCACGAGTTGCTGCTCTCGGATGGCTTCTGGGACGAGGTCTTCCGCGAACTGAGCATCCCATATCT
 GCCGGTGCCTGGAGCACCGACAACCCGACTCGATCGTCGACAAGAACGCTCGCGTCATGAATT
 GATCGCGGCCTACCGCAACCGCGGCCATCTGATGGCCGATACCGACCCGCTGCGGTTGGACAAAGC
 TCGGTTCCGCAGTCACCCGACCTCGAAGTGCTGACCCACGGCCTGACGCTGTGGGATCTCGATCGG
 GTGTTCAAGGTCGACGGCTTTGCCGGTGCGCAGTACAAGAACTGCGCGACGTGCTGGGCTTGCTG
 CGCGATGCCTACTGCCGCCACATCGGCGTGGAGTACGCCATATCCTCGACCCCGAACAAAAGGAG
 TGGCTCGAACAACGGGTCGAGACCAAGCACGTCAAACCCACTGTGGCCCAACAGAAATACATCCTC
 AGCAAGCTCAACGCCGCCGAGGCCCTTGAACGTTCTACAGACCAAGTACGTGCGCCAGAACGCG
 TTCTCGCTGGAAGGCGCCGAAAGCGTGATCCCGATGATGGACGCGCGCATCGACCAAGTGCCTGAG
 CACGGCCTCGACGAGGTGGTCATCGGGATGCCGCACCGGGGCCGGCTCAACGTGCTGGCCAACATC
 GTCGGCAAGCCGTAATCGCAGATCTTACCGAGTTCGAGGGCAACCTGAATCCGTGCGAGGCGCAC
 GGCTCCGGTGACGTCAAGTACCACCTGGGCGCCACCGGGCTGTACCTGCAGATGTTGGGCGACAAC
 GACATTAGGTGTCGCTGACCGCCAACCCGTCGCATCTGGAGGCCGTCGACCCGGTGCTGGAGGGA
 TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTCGACCACGGAAGCATCGACAGCGACGGCCAACGGGCGTT
 CTCGGTGGTGCCGCTGATGTTGCATGGCGATGCCGCGTTCGCCGGTCAGGGTGTGGTCGCCGAGAC
 GCTGAACCTGGCGAATCTGCCGGGCTACCGCGTCGGCGGCACCATCCACATCATCGTCAACAACCAG
 ATCGGCTTACCAACCGCGCCGAGTATTCAGGTCCAGCGAGTACTGCACCGACGTGCAAGATGA
 TCGGGGCACCGATCTTTCACGTCAACGGCGACGACCCGGAGGCGTGTGTCTGGGTGGCGCGGTTGG
 CGGTGGACTTCCGACAACGGTTCAAGAAGGACGTGTCATCGACATGCTGTGCTACCGCCGCCGCG
 GGCACAACGAGGGTGACGACCCGTCGATGACCAACCCCTACATGTACGACGTGTCGACACCAAGC
 GCGGGGCCCCGAAAAGCTACACCGAAGCCCTGATCGGACGTGGCGACATCTCGATGAAGGAGGCC
 GAGGACGCGCTGCGCGACTACAGGGCCAGCTGGAACGGGTGTTCAACGAAGTGCGCGAGCTGGA
 GAAGCACGGTGTGACGCCGAGCGAGTCGGTCGAGTCCGACCAGATGATTCCCGCGGGGCTGGCCA
 CTGCGGTGGACAAGTCGCTGCTGGCCCGGATCGGCGATGCGTTCTCGCCTTGCCGAACGGCTTCAC
 CGCGCACCCGCGAGTCCAACCGGTGCTGGAGAAGCGCCGGGAGATGGCCTATGAAGGCAAGATCG
 ACTGGGCCTTTGGCGAGTGCTGGCGCTGGGCTCGTGGTGGCCGAAGGCAAGCTGGTGCCTGTG
 CGGGGACAGGACAGCCGCCGCGGCACCTTCTCCAGCGGCATTGCTTCTCATCGACCGCCACACTG
 GCGAGGAGTTCACACCACTGCAGCTGCTGGCGACCAACTCCGACGGCAGCCCGACCGGCGGAAAGT
 TCTGGTCTACGACTCGCACTGTCGGAGTACGCCGCCGTCGGCTTCGAGTACGGCTACACTGTGGG
 CAATCCGGACGCGGTGGTGTCTGGGAGGCGCAGTTCGGCGACTTCGTCAACGGCGCACAGTCGAT
 CATCGACGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGTCGTGCTGCTGTA

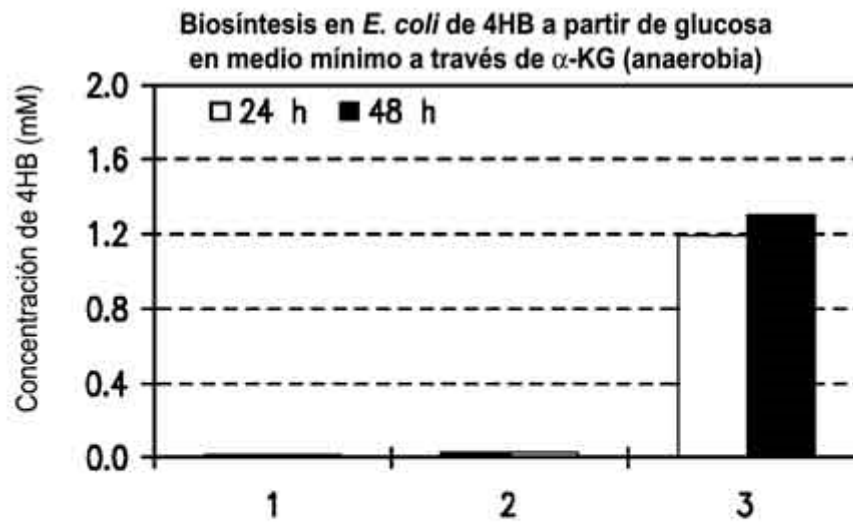
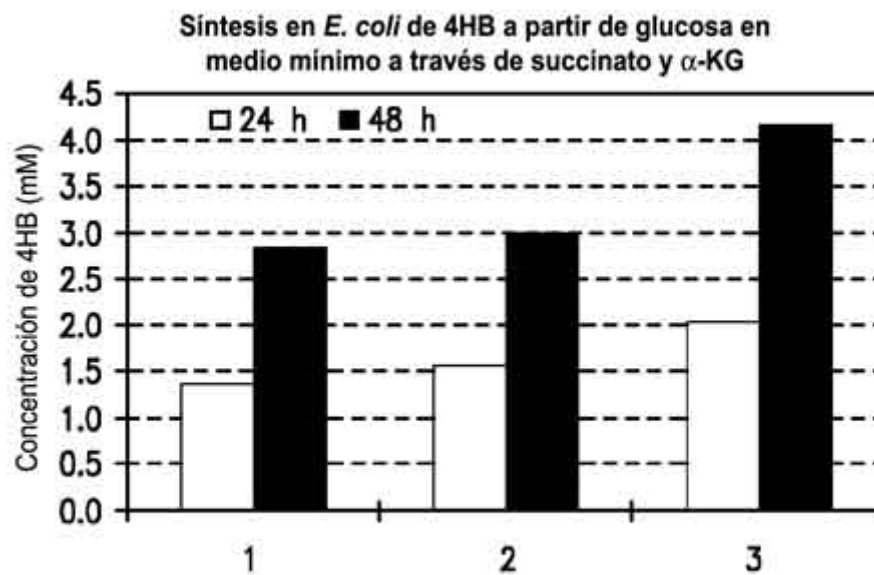
FIGURA 15

CCGCACGGGCACGAGGGGCAGGGACCCGACCACACTTCTGCCCGGATCGAACGCTTCTTGCA GTTG
 TGGGCGGAAGGTTTCGATGACCATCGCGATGCCGTGCGACTCCGTGGAACACTTCCACCTGCTACGCC
 GGCATGCCCTGGACGGCATCCAACGCCGCTGATCGTGTTCACGCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAA
 GGCCGCCGTGAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCCGCTCAGTGCTGGAGGAACCCAC
 CTATGAGGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTGAGCCGGATCCTGCTGACCAAGTGGCAAGCTGTA
 TTACGAGCTGGCCGCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACA
 GCTCGCCCCGCTGCCAGGCGTCTGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCAAGGAGTT
 CTTCTGGGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGCGTGGCCGCGATTGCGGCTCGAACTACCCGA
 GCTGCTGCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTCGTC
 AGGCTCGTCGAAGGTGCACGCCGTGCAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTCGGCTAA

B.

MANISSPFGQNEWLVEEMYRKFRDDPSSVDPSWHEFLVDYSPEPTSQPAAEPTRVTSPLVAERAAAAA
 PQAPPKPADTAAAGNGVVAALAAKTAVPPPAEGDEVAVLRGAAA VVKNMMSASLEVPTATSVRAVPA
 KLLIDNRIVINNQLKTRTRGGKISFTHLLGYALVQAVKKFPNMNRHYTEVDGKPTAVTPAHTNLGLAIDLQ
 GKDGRSLVVAGIKRCETMRFAQFVTAYEDIVRRARDGKLTTEDFAGVTISLTNPGTIGTVHSPRLMPG
 QGAIIGVGAMEYPAEFQGAEEERIAELGIGKLITLTSTYDHRIIQGAESGDFLRTIHELLSDGFWDDEVFREL
 SIPYLPVRWSTDNPDSDKARVMNLIAAYRNRGHLMA DTPLRLDKARFRSHPDLEVLTHGLTLWDL
 DRVFKVDGFAGAQYKKLRDVLGLLRDAYCRHIGVEYAHILDPEQKEWLEQRVETKHVKPTVAQQKYILSK
 LNAAEFETFLQTKYVGQKRFSLEGAESVIPMMDDAIDQCAEHGLDEVVIGMPHRGRNLVLANIVGKPY
 SQIFTEFEGNLNPSQAHGSGDVKYHLGATGLYLQMF GDNDIQVSLTANPSHLEAVDPVLEGLVRAKQDL
 LDHGSIDSDGQRAFSVVPLMLHGDAAFAGQGVVAETLNLANLPGYRVGGTIHIVNNQIGFTTAPEYSRS
 SEYCTDVAKMIGAPIFHVNGDDPEACVWVARLAVDFRQRFKKDVIDMLCYRRRRGHNEGDDPSMTNP
 YMYDVVDTKRGARKSYTEALIGRGDISMKEAEDALRDYQGGQLERVFNEVRELEKHGVQPSVESDQMI
 PAGLATAVDKSLLARIGDAFLALPNGFTAHPRVQPVLEKRRE MAYEGKIDWAFGELLALGSLVAEGKLVR
 LSGQDSRRGTFSQRHSLIDRHTGEEFTPLQLLATNSDGSPTGGKFLVYDSPLSEYAAVGFYGYTVGNPD
 AVVLWEAQFGDFVNGAQSIIDEFISSGEAKWGQLSNVLLLPHGHEGQGP DHTSARIERFLQLWAEGS
 MTIAMPSTPSNYFHLLRRHALDGIQRPLIVFTPKSMLRHKAAVSEIKDFTEIKFRSVLEEPTYEDGIGDRNK
 VSRILLTSGKLYYELAARKAKDNRNDLAIVRLEQLAPLPRRRLRETLD RYENVKEFFWVQEEPANQGAWP
 RFGLELPELLPKLAGIKRISRRAMSAPSSGSSKVHAVEQQEILDEAFG

FIGURA 15 (cont.)

**FIG. 16****FIG. 17**

A.

ATGGAAATCAAAGAAATGGTGAGCCTTGACGCAAGGCTCAGAAGGAGTATCAAGCTACCCATAAC
 CAAGAAGCAGTTGACAACATTTGCCGAGCTGCAGCAAAAGTTATTTATGAAAATGCAGCTATTCTGG
 CTCGCGAAGCAGTAGACGAAACCGGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGTGGCCAAGAATCAAGGC
 AAATCCAAAGGTGTTTGGTACAACCTCCACAATAAAAAATCGATTGGTATCCTCAATATAGACGAGC
 GTACCGGTATGATCGAGATTGCAAAGCCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTAACGCCGACGACCAACC
 CGATCGTTACTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGCCATCATTATTGCCCCC
 ACCCCAGATCCAAAAATGCTCTGCACACGCAGTTCGTCTGATCAAAGAAGCTATCGCTCCGTTCAA
 CGTACCGGAAGGTATGGTTCAGATCATCGAAGAACCAGCATCGAGAAGACGCAGGAACTCATGG
 GCGCCGTAGACGTAGTAGTTGCTACGGGTGGTATGGGCATGGTGAAGTCTGCATATTCTTCAGGAA
 AGCCTTCTTCGGTGTGGAGCCGGTAACGTTTCAGGTGATCGTGGATAGCAACATCGATTTTCAAGC
 TGCTGCAGAAAAAATCATCACCGGTCTGCTTTCGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGC
 ATCATCTACAACGAGGCTGACAAGGAAGCAGTTTTTCACAGCATTCCGCAACCACGGTGCATATTTCT
 GTGACGAAGCCGAAGGAGATCGGGCTCGTGCAGCTATCTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGAT
 GTAGTAGGTCAGAGCGTTGCCTTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTA
 TTCTCGTTGTTGAAGCTCGCGGCGTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAGATGTGTCCCG
 TAATGTGCGCCCTCAGCTACAAGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAA
 CGAAGGTAACGGCCACACCTGTGCTATCCACTCCAACAATCAGGCACACATCATCTCGCAGGATCA
 GAGCTGACGGTATCTCGTATCGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTACATCCAAA
 ACGGTCTTGCCGTAACCAATACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCCGAGAACTT
 CACTTACAAGCACCTCCTCAACATTTACGCATCGCACCGTTGAATTCAAGCATTACATCCCCGATG
 ACAAAGAAATCTGGGAACCTCTAA

B.

MEIKEMVSLARKAQKEYQATHNQEAVDNICRAAAKVIYENAAILAREAVDETGMGVYEHKVAKNQGKS
 KGVWYNLHNKKSIGILNIDERTGMIEIAKPIGVVGAVTPTTNPVTPMSNIIFALKTCNIIIIAPHPRSKCS
 AHAVRLIKEAIAPFNVPEGMVQIIEPSIEKTQELMGAVDVVATGGMGMMVKSAYSSGKPSFGVGAGN
 VQVIVDSNIDFEAAAEKIITGRAFDNGIICSQEQSIIYNEADKEAVFTAFRNHGAYFCDEAEGDRARAAIFE
 NGAIKDVVGQSVAFIAKKANINIEGTRILVVEARGVGAEDVICKEKMCPVMCALSYKHFEEGVEIARTN
 LANEGNGHTCAIHSNNQAHIILAGSELTVSRIVVNAPSATTAGGHIQNGLAVTNTLGCGSWGNNSEN
 TYKHLNISRIAPLNSSIHIPDDKEIWEL

FIGURA 18

A.

ATGCAACTTTTCAAACCTCAAGAGTGTAACACATCACTTTGACACTTTTGCAGAATTTGCCAAGGAATT
 CTGTCTTGGAGAACGCGACTTGGTAATTACCAACGAGTTCATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGC
 CAGCTCCCCTGCCATTTTGTATGCAGGAGAAATATGGGCAAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGA
 ATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCGCGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGT
 TATTGACATCTCTAAACTTTTCGTTCTGAAAGGATTAAATGATGTACTCGATGCATTGACCGCAAAA
 TACCTCTTATCAAAGAGAAAGAAGTATCATTGTGCCCACAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGA
 CGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAGCCGTACACCAAAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGT
 TGCAGACCATGCCATCATACACTGAACTTCTGAAGAGCTTGCCTTTCCACTTCTACGCATGCAGTG
 CAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATCTCCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGT
 TCAGTGAGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCAGAAAAATCGCCGAACACGGGCCCTGAAT
 ACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCAACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAAATG
 CAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGGAGGCAACTATCACGTGCCGCATGGAG
 AAGCAAACTATCAGTTCCTCACAGAGGTATTCAAAGTATACCAAAAAGAAGAATCCTTTCGGCTATAT
 AGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCCAGCCGAATACGTATATCCGAAGCTG
 GATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCACGAATACGGCATGAAGGACGAAGAG
 GTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAGATTGCTCGCCAACAACCTACGTAGAG
 CTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTACTAA

B.

MLFLKLSVTHHFDTFAEFAKEFCLGERDLVITNEFIYEPYMKACQLPCHFVMQEKYQGGEPSDEMNN
 NILADIRNIQFDRVIGIGGGTVIDISKLFVLKGLNDVLDADFDRKIPLIKEKELIIVPTTCGTGSEVTNISIAEIKSR
 HTKMGLADDAIVADHAIIPPELLKSLPFHYACSAIDALIHAIESYVSPKASPYSRLFSEAAWDIILEVFKKIAE
 HGPEYRFELKGEMIMASNYAGIAFGNAGVGAVHALSYPLGGNYHVPHGEANYQFFTEVFVKYQKKNPF
 GYIVELNWKLSKILNCQPEYVYPKLDLLGCLLTKPLHEYGMKDEEVRGFAESVLKTQQRLLANNYVELT
 VDEIEGIYRRLY

FIGURA 19

A.

ATGAAAGACGTATTAGCGGAATATGCCTCCCGAATTGTTTCGGCCGAAGAAGCCGTAAAACATATCA
 AAAATGGAGAACGGGTAGCTTTGTACATGCTGCCGGAGTTCCTCAGAGTTGTGTTGATGCACTGGT
 ACAACAGGCCGACCTTTTCCAGAATGTCGAAATTTATCACATGCTTTGTCTCGGCCGAAGGAAAATAT
 ATGGCACCTGAAATGGCCCTCACTTCGACACATAACCAATTTTGTAGGTGGTAATTCCTGTAAAGC
 AGTTGAGGAAAATAGAGCCGACTTCATTCCGGTATTCTTTATGAAGTGCCATCAATGATTCGCAAA
 GACATCCTTCACATAGATGTCGCCATCGTTCAGCTTTCAATGCCTGATGAGAATGGTACTGTAGTTT
 TGGAGTATCTTGCGATTATAGCAAACCGGCAGCAGAAAAGCGCTCATTTAGTTATAGGGGAAATCAA
 CCGTCAAATGCCATATGTACATGGCGACAACCTTGATTCACATATCGAAGTTGGATTACATCGTGATG
 GCAGACTACCCTATCTATTCTTGCAAAGCCCAAAATCGGAGAAGTAGAAGAAGCTATCGGGCGTA
 ATTGTGCCGAGCTTATTGAAGATGGTGCCACACTCCAACCTCGGTATCGGCGCGATTCTGTATGCAGC
 CCTGTTATTCCTCAAGGACAAAAAAGATCTGGGGATCCATACCGAGATGTTCTCCGATGGTGTGTC
 GAATTAGTTCGCAGTGGAGTAATTACAGGAAAGAAAAAGACACTTCACCCCGGAAAGATGGTCGCA
 ACCTTCTTAATGGGAAGCGAAGACGTATATCATTTTCATCGACAAAAATCCCGATGTAGAACTTTATCC
 GGTAGATTACGTCAATGATCCGCGAGTAATCGCTCAAAATGATAATATGGTCAGCATCAATAGCTGT
 ATCGAAATCGATCTTATGGGACAAGTCGTGTCCGAATGTATAGGAAGCAAGCAATTCAGCGGAACC
 GGCGGTCAAGTAGATTATGTTCTGGAGCAGCATGGTCTAAAAACGGCAAAAGCATCATGGCAATT
 CCCTCAACAGCCAAAAACGGTACTGCATCTCGAATTGTACCTATAATTGCAGAGGGAGCTGCTGTAA
 CAACCTCCGCAACGAAGTCGATTACGTTGTAACCGAATACGGTATAGCACAACTCAAAGGAAAGA
 GTTTGCGCCAGCGAGCAGAAGCTTATTGCCATAGCCACCCGGATTTCAGAGAGGAACTAACGA
 AACATCTCCGCAACGTTTCGGATAA

B.

MKDVLAEYASRIVSAEEAVKHIKNGERVALSHAAGVPQSCVDALVQQADLFQNVFIYHMLCLGEGKYM
 APEMAPHFRHITNFVGGNSRKAVEENRADFIPVFFYEVPSMIRKDILHIDVAIVQLSMPDENGYSFGVS
 CDYSKPAAESAHLVIGEINRQMPYVHGDNLHISKLDYIVMADYPIYSLAKPKIGEVEEAIGRNCAELIEDG
 ATLQLGIGAIPDAALLFLKDKDLGIHTEMFSDGVVELVRSGVITGKKKTLHPGKMOVATFLMGSEVDYHFI
 DKNPDVELYPVDYVNDPRVIAQNDNMVSINSCIEIDLMGQVVSECIGSKQFSGTGGQVDYVRGAAWSK
 NGKSIMAIPTAKNGTASRIVPIIAEGAAVTTLRNEVDYVVTEYGIAQLKGKSLRQRAEALIAIHPDFREEL
 TKHLRKRFG

FIGURA 20

A.

ATGATTAAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAGTTGC
TGTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTAAGAGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCAGATGCTATTCTTGTGGAGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAAATAGGA
ATGGAIGTAAATGATTTTGAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
AGTAGAGCTTGTATCAACTGGAAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAAATACAGCAA
CTTTCTTAAGATCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGACTTAGAACAGGAAAACTATGCTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATAGACTATTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAGGAAAAAATTGATATAGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
CAATAGGAATTGAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCCCTAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCTTTAGCACTTGATATAGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AGGGAGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATAGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACCTGATTCAAAAAATGGAGGAATCTTAGT
TGGAACCTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCAAGAGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAAC
CTATAGCACTTGACAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

B.

MIKSFNEIIMKVKSKEKMKVAVAVAVAQDEPVLEAVRDAKKNGIADAILVGDHDEIVSIALKIG
MDVNDFEIVNEPNVKKAAALKAVELVSTGKADMVMKGLVNTATFLRSVLNKEVGLRTGKTMSH
VAVFETEXFDRLFLTDVAFNTYPELKEKIDIVNNSVKVAHAIGIENPKVAPICAVEVINPK
MPSTLDAAMLSKMSDRGQIKGCVDGPLALDIALSEEAHHKGVGTGEVAGKADIFLMPNIET
GNVMYKTLTYTTDSKNGGILVGTSAPVVLTSRADSHETKMNSIALAALVAGNK

FIGURA 21

A.

ATGTATAGATTACTAATAATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATTGGTATTTATGACGA
 TGAAGAGAGATATTTGAGAAGACTTTAAGACATTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACA
 CTATATTTGATCAATTTCAATTCAGAAAGAATGTAATTTTAGATGCGTTAAAAGAAGCAAAC
 ATAGAAGTAAGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGAAGAGCGGACTCTTAAAGCCAATAGTAAG
 TGGAACTTATGCAGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGAGTTCAAGGTCAGC
 ATGCGTCAAAATCTTGGTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAAAGAAATAAATGTTCCAGCA
 TACATAGTTGATCCAGTTGTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCAAGAAATATCAGGAATGGC
 TGACATTCCAAGAAAAAGTATATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGAAGATATG
 CAAAAGAAGTTGGAAAAAATACGAAGATCTTAATTTAATCGTAGTCCACATGGGTGGAGGT
 ACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGTAGAGTAATAGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGA
 AGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAGTGGTGGAGTTCCAATAGGAGATCTTGTAAGATTGTGCT
 TCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGAAAAAGATAAAACGGCAAAGGCGGAGTTGTT
 AGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAAGGCTGTAGTTGATAAAGCTCTTGAAGGAGATAAGAA
 ATGTGCACTTATATATGAAGCTTTCACATTCAGGTAGCAAAAGAGATAGGAAAAATGTTCAA
 CCGTTTTAAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCGGAATTGCGTACAACGAGCAT
 GTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAATTCATAGCACCTGTAGTTAGATATGGTGGAGA
 AGATGAACTTCTTGCACTTGCAAGGTTGACTTAGAGTTTTAAGAGGAGAAGAAAAAGCTA
 AGGAATACAAATAA

B.

MYRLLIINPGSTSTKIGIYDDEKEIFEKTLRHSAAEEIEKYNTIFDQFQFRKNVILDALKEAN
 IEVSSSLNAVVGRLGKLLKPIVSGTYAVNQKMLEDLKVGVGQGHASNLGGIIANEIAKEINVPA
 YIVDPVVVDDELDEVSRIKSMADIPRKSIFHALNQKAVARRYAKEVGKKYEDLNLIIVHMGGG
 TSVGTHKDGRIEVNNTLDGEGPFSPESSGGVPIGDLVRLCFNKNYTYEEVMKKINGKGGVV
 SYLNTIDFKAVVDKALEGDKKCALIYEAFTFQVAKEIGKCSTVLKGNVDAILTGGIAYNEH
 VCNAIEDRVKFIAPVVRYGGEDELLALAEGLRLVLRGEEKAKEKYK

FIGURA 22

A.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTGCTGTAGCACAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCAGATGCTATTCTTGTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCATCGCGCTTAAAAATAGGC
ATGGATGTAATGATTTTGAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAAATACAGCAA
CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGACTGAGAACAGGAAAAACTATGCTCAC
GTTGCAGTATTTGAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAGGAAAAAATTGATATCGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
CAATAGGTATTGAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCCCTAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCGTTAGCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AGGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACCTGATAGCAAAAATGGCGGAATCTTAGT
TGGAACCTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAAC
CTATTGCACTTGAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

B.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTGCTGTAGCACAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCCGATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTGCTATCGCGCTGAAAAATAGGC
ATGGATGTAATGATTTTGAATTTGTTAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGTTAAAGGC
AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTGGTAAATACCGCAA
CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACAGGAAAAACCATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAGGAAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCACATG
CCATTGGTATTGAAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCGCTGGCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AAGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACGTTAACCTATACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCTGGT
TGGAACCTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAAC
CTATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA

FIGURA 23

C.

ATGATTAAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTCGTGTTGCACAAGACGAGCCGGTACTGGAAGCGGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCCGATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTCTCTATCGCGCTGAAAAATTGGC
ATGGAIGTTAATGATTTTTGAAATTGTTAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGCTGAAGGC
GGTAGAGCTGGTTTTCCACCGGAAAAAGCTGATATGGTAATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CTTTCTACGCAGCGTACTGAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACCGGAAAAACCATGAGTCAC
GTTGCGGTATTTGAAACTGAGAAATTGATCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAAGAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCGCATG
CCATTGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCCGCAATGCTTAGCAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAAGG
TTGTGIGGTTGACGGCCCGCTGGCACTGGATATCGCGTTAAGCGAAGAAGCGGCACATCATA
AAGGCGTAACCGGCGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTGATGCCAAACATTGAAACA
GGCAATGTAATGTATAAAACGTTAACCTATAACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCCTGGT
TGGAACTTCTGCACCAAGTTGTTTTAACCTCACGCGCTGACAGCCATGAAACCAAAATGAACA
GCATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA

D.

ATGATTAAAAGTTTTAACGAAATTATCATGAAAGTGAAAAGCAAAGAGATGAAAAAAGTGGC
GGTTGCGGTTGCGCAGGATGAACCGGTGCTGGAAGCGGTGCGCGATGCCAAAAAACCGTA
TTGCCGATGCCATTCTGGTGGGCGATCAGATGAAATTGTCTCTATTGCGCTGAAAAATTGGC
ATGGAIGTTAACGATTTTTGAAATTGTTAATGAACCGAACGTGAAAAAAGCGGCGCTGAAAGC
GGTTGAAGTGGTTTTCCACCGGTAAAGCCGATATGGTGATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CCTTCTGCGCAGCGTGCTGAATAAAGAAGTGGGTCTGCGTACCGGTAAAACCATGAGTCAT
GTTGCGGTGTTTGAACCGAAAAATTGACCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCGTTTTAA
TACCTATCCGGAAGTGAAGAGAAAAATTGATATCGTTAATAACAGCGTGAAAGTGGCGCATG
CCATTGGTATTGAAAACCGAAAGTGGCGCGGATTTGCGCGGTTGAAGTGATTAAACCCGAAA
ATGCCGTCAACGCTGGATGCCGCGATGCTCAGCAAAATGAGCGATCGCGGTCAAATCAAAGG
CTGTGIGGTTGATGGCCCGCTGGCGCTGGATATCGCGCTTAGCGAAGAAGCGGCGCATCATA
AAGGCGTGACCGGCGAAGTGGCCGGTAAAGCCGATATTTTCTGATGCCGAATATTGAAACC
GGCAACGTGATGTATAAAACGCTGACCTATAACCCGACAGCAAAAACCGCGGCATTCTGGT
GGGTACCAGCGCGCCGGTGGTGTGACCTCGCGCGCCGACAGCCATGAAACCAAAATGAACA
GCATTGCGCTGGCGGCGCTGGTGGCCGGTAATAAATAA

FIGURA 23 (cont.)

A.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
 AAAAGAGATATTTGAGAAGACTTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACACTATAT
 TTGATCAATTTTCAGTTCAGAAAGAATGTAATTTCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTA
 AGTTCCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATAGTAAGTGGAACCTTATGC
 AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGCGTTCAAGGTCAGCATGCGTCAAATCTTG
 GTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAAGAAATAAATGTTCCAGCATAACATCGTTGATCCAGTT
 GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCACGTATATCAGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
 ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGACGCTATGCAAAAAGAAGTTGGAAAAAATACG
 AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
 AGAGTAATTGAAGTTAATAACACTTTGATGGAGAAGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAGTGGTGG
 CGTTCCAATAGGCGATCTTGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGA
 AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTT
 GATAAAGCTCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACCTTATATATGAAGCTTTCACATTCCAGGTAGC
 AAAAGAGATAGGAAATGTTCAACCGTTTAAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCG
 GAATTGCGTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAAATTCATTGCACCTGTA
 GTTCGTTATGGTGGAGAAGATGAACCTTCTGCACTTGCAGAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
 AGAAGAAAAAGCTAAGGAATACAAATAA

B.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
 AAAAGAGATATTTGAGAAGACGTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATAT
 TTGATCAATTTTCAGTTCGCAAGAATGTGATTTCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
 AGTTCCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATTGTCAGTGGAACCTTATGC
 AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTGGGCGTTCAAGGTCAGCATGCCAGCAATCTTG
 GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCAAAAGAAATCAATGTTCCAGCATAACATCGTTGATCCGGTT
 GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTAGCCGTATAAGCGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
 ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTCGTCGCTATGCAAAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
 AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
 CGCGTGATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGTGGTGG
 CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTGATGA
 AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTT
 GATAAAGCGCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACCTGATTTATGAAGCTTTCACCTTCCAGGTAGC
 AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTTAAAAGGAAATGTTGATGCCATTATCTTAACAGGCG
 GCATTGCTTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAATTCATTGCACCTGTA
 GTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
 CGAAGAAAAAGCGAAGGAATACAAATAA

FIG. 24

C.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
 AAAAGAGATATTTTGAGAAAACGTTACGTCATAGCGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATTT
 TTGATCAATTTTCAGTTCGCGCAAGAATGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
 AGTTCGCTGAATGCGGTAGTTGGTCGCGGCGGTCTGCTGAAGCCAATTGTCAGCGGCACCTTATGC
 GGTAATCAAAAAATGCTGGAAGACCTGAAAGTGGGCGTTGAGGGGAGCATGCCAGCAATCTTG
 GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCCAAAGAAATCAATGTTCCGGCATAACATCGTTGATCCGGTT
 GTTGTGGATGAGCTGGATGAAGTTAGCCGTATCAGCGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
 TTTCCATGCACTGAATCAAAAAGCGGTTGCGCGTCTGCTATGCAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
 AAGATCTTAATCTGATCGTGGTGCATATGGGTGGCGGTACTAGCGTCGGTACTCATAAAGATGGT
 CGCGTGATTGAAGTTAATAACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGCGGTGG
 CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACCTATGAAGAAGTGATGA
 AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAGGCGGTAGTT
 GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCGTTACCTTCCAGGTGGC
 AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTCTGAAAGGCAATGTTGATGCCATTATCCTGACCGGCG
 GCATTGCTTACAACGAGCATGTTTGTAAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAATTCATTGCACCTGTG
 GTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACTGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGTCTGCGCGTTTACGCGG
 CGAAGAAAAAGCGAAAGAATACAAATAA

D.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAACCCGGGCGAGCACCTCAACCAAATTTGGTATTTACGACGATGA
 AAAAGAGATTTTTGAAAAACGCTGCGTCACAGCGCAGAAGAGATTGAAAAATACAACACCATTT
 TCGATCAGTTCCAGTTCGCGAAAAACGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCCAATATTGAAGTC
 TCCTCGCTGAATGCGGTGGTCGGTCGCGGCGGTCTGCTGAAACCGATTGTCAGCGGCACCTTATGC
 GGTTAATCAGAAAATGCTGGAAGATCTGAAAGTGGGCGTGCAGGGGAGCATGCCAGCAATCTCG
 GCGGCATTATCGCCAATGAAATCGCCAAAGAGATCAACGTGCCGGCTTATATCGTTCGATCCGGTG
 GTGGTTGATGAACTGGATGAAGTCAGCCGTATCAGCGGCATGGCGGATATTCCGCGTAAAAGCAT
 TTTCCATGCGCTGAATCAGAAAGCGGTTGCGCGTCTGCTATGCCAAAGAAGTGGGTAAAAAATATG
 AAGATCTCAATCTGATTGTGGTGCATATGGGCGGCGGCACCAGCGTCGGTACGCATAAAGATGGT
 CGCGTGATTGAAGTGAATAACACGCTGGATGGCGAAGGGCCGTTCTCGCCGGAACGTAGCGGCGG
 CGTGCCGATTGGCGATCTGGTGCGTCTGTGTTTCAGCAATAAATACACCTACGAAGAAGTGATGA
 AAAAAATCAACGGCAAAGGCGGCGTGGTTAGCTATCTGAATACCATCGATTTTAAAGCGGTGGTT
 GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAAAAATGCGCGCTGATTTATGAAGCGTTTACCTTCCAGGTGGC
 GAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTGCTGAAAGGCAACGTTGATGCCATTATTCTGACCGGCG
 GCATTGCTTATAACGAACATGTTTGTAAATGCCATTGAAGATCGCGTGAAATTTATTGCGCCGGTG
 GTGCGTTACGGCGGCGAAGATGAACTGCTGGCGCTGGCGGAAGGCGGTCTGCGCGTGCTGCGCGG
 CGAAGAAAAAGCGAAAGAGTACAAATAA

FIG. 24 (cont.)

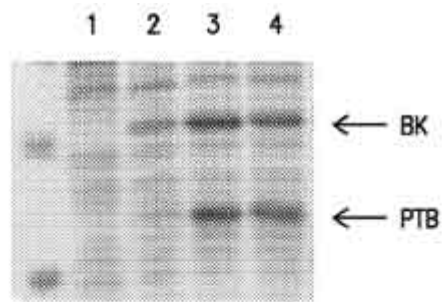


FIG. 25A

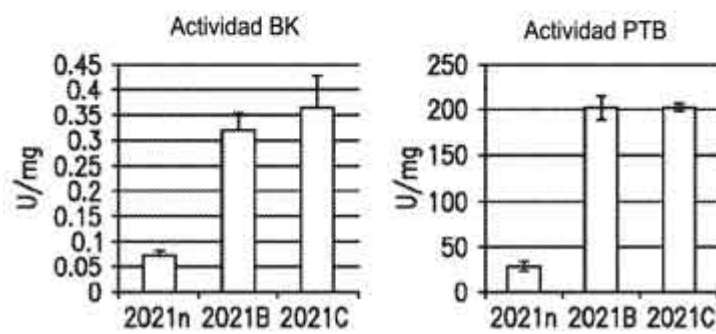


FIG. 25B

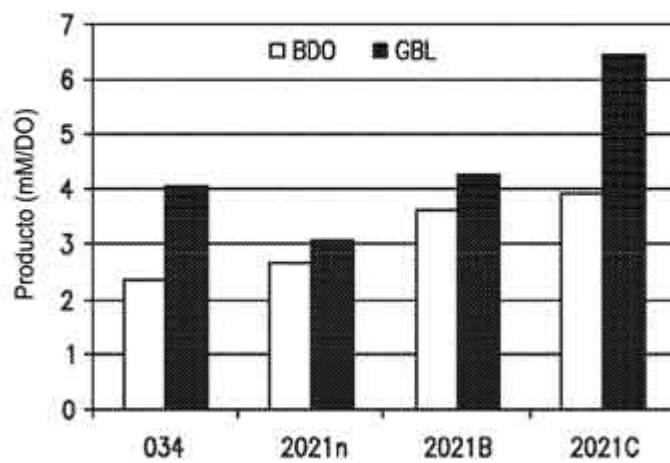


FIG. 26

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCTTTCATGTTTCGGAGTATTCGAAAAATGTTGAAAATGCTA
 TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAAAGAGAAAAA
 ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTAGA
 AGAAACACATATGGGAAGATATGAGGATAAAATATTAAAACATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
 CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCTTGGTCAGGTGATAATGGTCTTACAGTTGTAGAAATG
 TCTCCATATGGTGTTATAGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACCTGAAACTGTAATATGTAA
 TAGCATAGGCATGATAGCTGCTGCCAAATGCTGCTAGTATTTAACCGACACCCATGCCCTAAAAAAT
 GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTTCATGTGGCGGTCTGAAAATCTA
 GTAACAACTATAAAAAATCCAACCTATGGAGTCTCTAGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
 ACTTCTTTGCGGAACCTGGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCCTCTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
 TAGGTGCTGGTGCTGGAATCCACCAGTTATTGTAGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
 AGGAGCATCATTTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
 TGTTTTTGAGAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
 ATGAAGATCAAGTATCAAAAATTAATAGATTTAGTATTACAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
 TTTATAAACAAAAAATGGGTAGGAAAAGATGCAAAATTATTCTTAGATGAAATAGATGTTGAGTC
 TCCTTCAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAATCATCCATTTGTTTATGACAGAAC
 TCATGATGCCAATATTGCCAATTGTAAGAGTTAAAGATATAGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
 ATAGCAGAACAAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATAGACAACCTAAATAG
 ATTTGAAAGAGAAATAGATACTACTATTTTTTGTAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
 ATGAAGCAGAAGGATTTACAACCTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
 AGGAATTTTACAAGACAAAGAAGATGTGTACTTGCCGGCTAA

B.

MNKDTLIPTTKDLKVKTNGENINLKNYKDNSSCFGVFENVENAISSAVHAQKILSLHYTKEQREK
 IITEIRKAALQNKEVLATMILEETHMGRYEDKILKHELVAKYTPGTEDLTTTAWSGDNLTVVEM
 SPYGVIGAITPSTNPETVICNSIGMIAAGNAVVFENGHPCAKKCVAFVEMINKAII SCGGPENL
 VTTIKNPTMESLDAIIKHPSIKLLCGTGGPGMVKTLNLNSGKKAIGAGAGNPPVIVDDTADIEKAG
 RSIIIEGCSFDNNLPCIAEKEVFVFNVAADDLISNMLKNNNAVIINEDQVSKLIDLVLQKNNETQEY
 FINKKWVGKDAKLFLDEIDVESPSNVKCIICEVNANHPFVMTELMMPILPIVRVKDIDEAIIKYAK
 IAEQNRKHSAYIYSKNIDNLRNFEREIDTTIFVKNAKSFAGVGYEAEGFTTFTIAGSTGEGITSA
 RNFTQRRCVLAG

FIG. 27

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCTTCATGTTTCGGCGTATTTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
 TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
 ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGATTACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTGGA
 AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAAATATTTAAAACATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
 CTGCTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGTCAGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
 TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACCTGAAACTGTAATATGTAA
 TAGCATAGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
 GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTTCATGTGGCGGTCTGAAAATCTG
 GTAACAACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
 ACTTCTTTGCGGAACTGGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
 TAGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
 CGTAGCATCATTTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
 TGTTTTTGAGAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
 ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
 TTTATAAACAAAAAATGGGTAGGAAAGATGCAAAATTATTCTCGATGAAATAGATTGTTGAGTC
 TCCTTCAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
 TGATGATGCCAATATTGCCAATTGTACGCGTTAAAGATATCGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
 ATAGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATCGACAACCTGAATCG
 CTTTGAACGTGAAATAGATACTACTATTTTTTGTAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
 ATGAAGCAGAAGGATTTACAACCTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
 CGTAATTTTACACGCCAACGTCGCTGTGTACTTGCCGGCTAA

B.

ATGAATAAAGACACACTGATCCCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
 TCAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCGCTGCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
 ATCATCACTGAGATACGTAAGGCCGATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCTACAATGATTCTGGA
 AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAAATATTTAAAACATGAACTGGTAGCTAAATATACTC
 CTGCTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
 TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACCAATCCAACCTGAAACTGTAATTTGTAA
 TAGCATTGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
 GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAGGCAATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAATACTG
 GTAACAACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
 ACTGCTTTGCGGAACTGGCGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
 TTGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTGATGATACTGCTGATATTGAAAAGGCTGGT
 CGTAGCATCATTTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
 TGTTTTTGAGAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTGAAAAAATAATGCTGTAATTATCA
 ATGAAGATCAGGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
 TTTATCAACAAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAAATTATTCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
 TCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCCAATCATCC

FIG. 28

ATTTGTTATGACAGAAGCTGATGATGCCAATATTGCCAATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAG
CTATTAAATATGCAAAGATTGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAAT
ATCGACAACCTGAATCGCTTTGAACGTGAAATCGATACTACTATTTTTGTAAAGAATGCTAAATC
TTTTGCTGGTGTGGTTATGAAGCAGAAGGATTTACCACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTG
AGGGCATAACCTCTGCACGTAATTTTACCCGCCAACGTCGCTGTGTACTGGCCGGCTAA

C.

ATGAATAAAGACACGCTGATCCCGACAACCTAAAGATCTGAAAGTAAAAACCAATGGTGAAAACAT
TAATCTGAAGAACTACAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TCAGCAGCGCGGTACACGCACAAAAGATACTCTCGCTGCATTATACCAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATCACTGAGATCCGTAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCAACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAAATACTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATATACGC
CTGGTACTGAAGATTTAACCACCACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACCGTTGTGGAAATG
TCGCCCTTATGGTGTATTATTGGTGCAATTACGCCCTTCAACCAATCCAACCTGAAACGGTAATTTGTAA
TAGCATTGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCGGTAGTATTTAACGGTCACCCCTGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAAGCGATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAAAATCTG
GTAACCACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCGCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATCAA
ACTGCTGTGCGGCACTGGCGGTCCAGGAATGGTGAAAACCTGCTGAATAGCGGTAAGAAAGCGA
TTGGTGTCTGGTGTGAAATCCACCAGTTATTGTGCGATGATACTGCTGATATTGAAAAAGCGGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTTGAGAATGTTGCCGATGATCTGATCTCTAACATGCTGAAAAATAATGCGGTGATTATCA
ATGAAGATCAGGTTAGCAAACTGATCGATCTGGTATTACAAAAAATAATGAACTCAAGAATAC
TTTATCAACAAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAACTGTTTCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
GCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCCAATCATCCATTTGTGATGACCGAAC
TGATGATGCCAATTTTGCCGATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAGCGATTAAATATGCAAAG
ATTGCAGAACAAAATCGTAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAATATCGACAACCTGAATCG
CTTTGAACGTGAAATCGATACCACTATTTTTGTGAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTGGTT
ATGAAGCAGAAGGTTTACCACTTTCACTATTGCTGGAAGCACCGGTGAAGGCATTACCTCTGCA
CGTAATTTTACCCGCCAACGTCGCTGTGTACTGGCCGGCTAA

D.

ATGAATAAAGATACGCTGATCCCGACCACCAAAGATCTGAAAGTAAAAACCAACGGCGAAAATAT
CAACCTGAAAAACTATAAAGATAACAGCAGTTGCTTTGGCGTGTTTGAAAACGTTGAAAACGCCA
TCTCCAGCGCGGTGCATGCGCAAAAAATTCTCTCGCTGCATTACACCAAAGAGCAGCGTGAAAAA
ATTATCACCGAAATCCGTAAAGCGGCGCTGCAAAACAAAGAAGTGCTGGCAACCATGATCCTGGA
AGAAACGCATATGGGGCGTTATGAAGATAAAATTCTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATACACGC
CGGGCACTGAAGATCTGACCACCACCGCCTGGAGCGGCGATAACGGCCTGACCGTGGTGGAGATG
TCGCCCTTATGGCGTGATTGGCGCGATTACGCCGTCAACCAACCCGACCGAAACGGTGATTTGTAA
CAGCATTGGCATGATTGCCGCGGGTAATGCGGTGGTGTTTAACGGTCATCCCTGCGCGAAAAAAT
GTGTGGCGTTTGCCGTTGAGATGATCAACAAAGCGATTATCAGCTGCGGCGGCCCGGAAAAATCTG
GTGACCACCATCAAAAATCCGACCATGGAATCGCTGGATGCCATTATCAAACATCCTTCCATCAA
ACTGCTGTGCGGCACCGGCGGCCCCGGGCATGGTGAAAACGCTGCTGAACAGCGGTAAAAAAGCGA
TTGGCGCGGGCGCGGGTAACCCGCGGTGATTGTGATGACACCGCCGATATT

FIG. 28 (cont.)

GAAAAAGCGGGGCGTAGCATTATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAACAACCTGCCCTGCATTGCCGA
 AAAAGAAGTGTTTGTCTTTGAAAACGTCGCCGATGATCTGATCAGCAATATGCTGAAAAACAACG
 CCGTGATTATCAATGAAGATCAGGTTAGCAAACCTGATCGATCTGGTGCTGCAAAAAACAACGAA
 ACGCAGGAATATTTTATCAACAAAAAATGGGTTGGTAAAGATGCCAACTGTTTCTCGATGAAAT
 CGATGTTGAATCGCCGTCTAACGTGAAATGTATTATCTGCGAAGTGAACGCCAACCATCCGTTTG
 TGATGACCGAACTGATGATGCCGATTCTGCCGATTGTGCGCGTGAAAGATATCGATGAAGCGATT
 AAATATGCCAAAATTGCCGAACAAAACCGTAAACACAGCGCCTATATTTACAGCAAAAATATCGA
 TAACCTGAACCGCTTTGAACGTGAAATCGATACCACCATTTTGTGAAAAATGCCAAAAGTTTGT
 CCGGCGTTGGTTATGAAGCGGAAGGTTTACCACCTTTACCATTGCCGGTAGCACCGGCGAAGGC
 ATTACCAGCGCCCGTAATTTTACC CGCCAGCGTCGCTGCGTGCTGGCGGGCTAA

FIG. 28 (cont.)

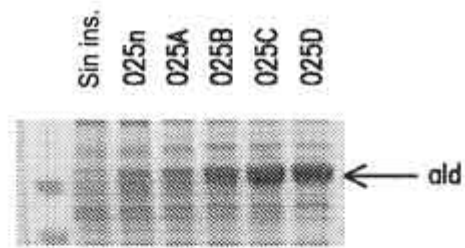


FIG. 29

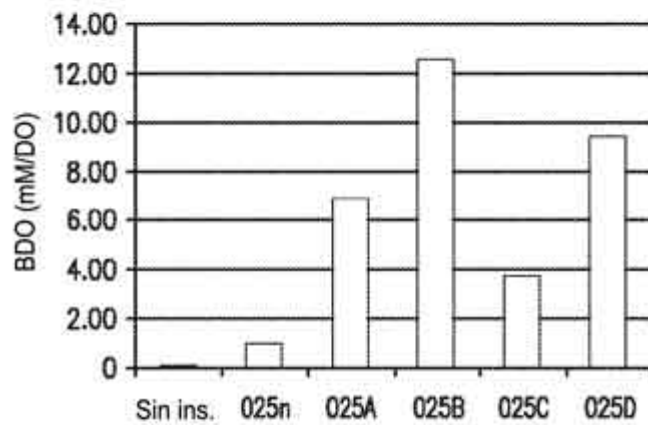


FIG. 30A

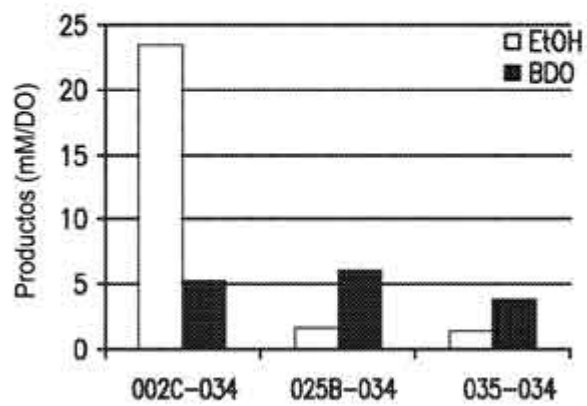


FIG. 30B

A.

ATGAAAGCTGCAGTAGTAGAGCAATTTAAGGAACCATTAAAAATTAAAGAAGTGAAAAAGCCATC
TATTTTCATATGGCGAAGTATTAGTCCGCATTAAAGCATGCGGTGTATGCCATACGGACTTGACG
CCGCTCATGGCGATTGGCCAGTAAAACCAAACTTCCTTTAATCCCTGGCCATGAAGGAGTCGGA
ATTGTTGAAGAAGTCGGTCCGGGGGTAACCCATTTAAAAGTGGGAGACCGCGTTGGAATTCCTTG
GTTATATTCTGCGTGCGGCCATTGCGAATATTGTTTAAAGCGGACAAGAAGCATTATGTGAACATC
AACAAAACGCCGGCTACTCAGTCGACGGGGGTATGCAGAATATTGCAGAGCTGCGCCAGATTAT
GTGGTGAAAATTCCTGACAACTTATCGTTTGAAGAAGCTGCTCCTATTTTCTGCGCCGGAGTTAC
TACTTATAAAGCGTTAAAAGTCACAGGTACAAAACCGGGAGAATGGGTAGCGATCTATGGCATCG
GCGGCCCTTGACATGTTGCCGTCCAGTATGCGAAAGCGATGGGGCTTCATGTTGTTGCAGTGGAT
ATCGGCGATGAGAACTGGAACCTTGCAAAAGAGCTTGGCGCCGATCTTGTTGTAAATCCTGCAAA
AGAAAATGCGGCCCAATTTATGAAAGAGAAAGTCGGCGGAGTACACGCGGCTGTTGTGACAGCTG
TATCTAAACCTGCTTTTCAATCTGCGTACAATCTATCCGCAGAGGCGGCACGTGCGTGCTTGTC
GGATTACCGCCGGAAGAAATGCCTATTCCAATCTTTGATACGGTATTAAACGGAATTTAAATTAT
CGGTTCCATTGTGCGCACGCGGAAAGACTTGCAAGAAGCGCTTCAGTTCGCTGCAGAAGGTAAAG
TAAAAACCATTTATTGAAGTGCAACCTCTTGAAAAAATTAACGAAGTATTTGACAGAATGCTAAAA
GGAGAAATTAACGCACGGGTTGTTTTAACGTTAGAAAATAATAATTAA

B.

MKA AVVEQFKEPLKIKEVEKPSISYGEVLVRIKACGVCHTDLHAAHGDWVPVKPLPLIPGHEGVG
IVEEVGPGVTHLKVGDVRVGI PWLYSACGHCEYCLSGQEALCEHQQNAGYSVDGGYA EYCRAAPDY
VVKI PDNLSFEEAAPIFCAGVT TYKALKVTG TKPGEWVAIYGI GGLGHVAVQYAKAMGLHVAVD
IGDEKLELAKELGADLVVNPAKENAAQFMKEKVGGVHAAVVTAVSKPAFQ SAYNS IRRGGTCVLV
GLPPEEMPIPIFDTVLNGIKIIGSIVGTRKDLQEALQFAAEGKVKTIIIEVQPLEKINEVFDRMLK
GEINGRVVLTLENNN

FIG. 31



FIG. 32A

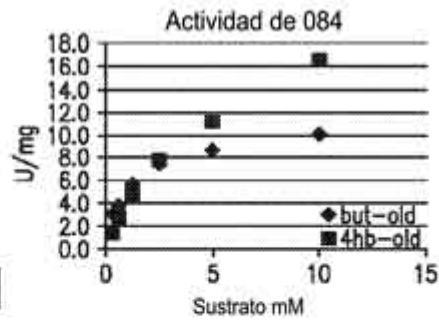


FIG. 32B

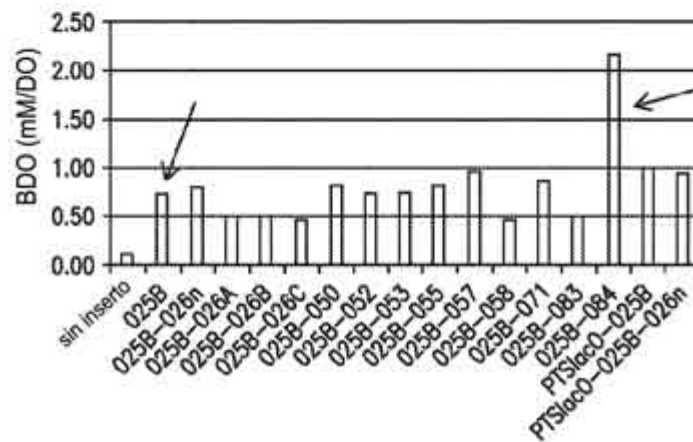


FIG. 33

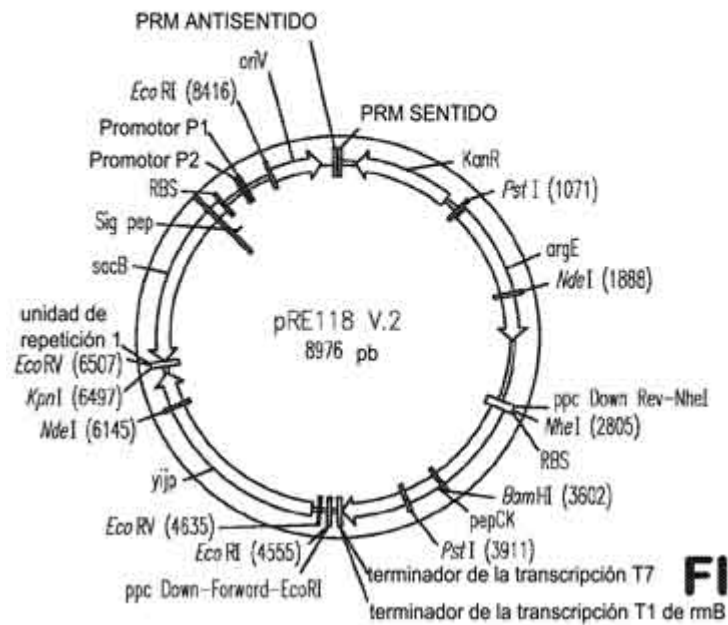


FIG. 34

A.

aTGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAATCACCGAGATCCTGGTC
 AAAGTGGGCGACAAAGTTGAAGCCGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCCTCTATG
 GAAGTTCGTCTCCGCAGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTTGGCGATAAAACCCAG
 ACCGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCCGACGGTGCAGCAGACGCTGCACCTGCTCAGGCAG
 AAGAGAAGAAAGAAGCAGCTCCGGCAGCAGCACCAGCGGCTGCGGCGGCAAAAGACGTTAACGTT
 CCGGATATCGGCAGCGACGAAGTTGAAGTGACCGAAATCCTGGTGAAAGTTGGCGATAAAGTTGAA
 GCTGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGTTCGGGCTCCGTTTGCTG
 GCACCGTGAAAGAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAAAGTGTCTACCGGCTCGCTGATTATGGTCT
 TCGAAGTCGCGGGTGAAGCAGGCGCGGCAGCTCCGGCCGCTAAACAGGAAGCAGCTCCGGCAGCG
 GCCCTGCACCAGCGGCTGGCGTGAAGAAGTTAACGTTCCGGATATCGGCGGTGACGAAGTTGAA
 GTGACTGAAGTGATGGTGAAAGTGGGCGACAAAGTTGCCGCTGAACAGTCACTGATCACCGTAGAA
 GGGCGACAAAGCTTCTATGGAAGTTCGGGCGCGCTTTCAGGCGCTCGTGAAGGAAGTGAAGTCAAC
 GTTGGCGATAAAGTGAAGTGGCTCGCTGATTATGATCTTCGAAGTTGAAGGCGCAGCGCTCGG
 GCAGCTCTGCGAAACAGGAAGCGGCAGCGCCGGCACCAGGCGAGCAAAAGCTGAAGCCCCGGCAGC
 AGCACCAGCTGCGAAAGCGGAAGGCAAATCTGAATTTGCTGAAAACGACGCTTATGTTACGCGAC
 TCCGCTGATCCGCCGTCTGGCACGCGAGTTTGGTGTTAACCTTGCAGAAAGTGAAGGGCACTGGCCG
 TAAAGGTCGATCCTGCGCGAAGACGTTACAGGCTTACGTGAAAGAAGCTATCAAACGTGCAGAAGC
 AGCTCCGGCAGCGACTGGCGGTGGTATCCCTGGCATGCTGCCGTGGCCGAAGGTGGACTTCAGCAA
 GTTGGTGAAATCGAAGAAGTGGAACTGGGCCGCATCCAGAAAATCTCTGGTGCGAACCTGAGCCG
 TAACTGGGTAATGATCCCGCATGTTACTCACTTCGACAAAACCGATATCACCGAGTTGGAAGCGTTC
 CGTAAACAGCAGAACGAAGAAGCGGCGAAACGTAAGCTGGATGTGAAGATCACCCCGGTTGTCTTC
 ATCATGAAAGCCGTTGCTGCAGCTCTTGAGCAGATGCCTCGCTTCAATAGTTCGCTGTCGGAAGACG
 GTCAGCGTCTGACCCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGTGGCGGTGGATACCCCGAACGGTCTGG
 TTGTTCCGGTATTCAAAGACGTCAACAAGAAAGGCATCATCGAGCTGTCTCGCGAGCTGATGACTAT
 TTCTAAGAAAGCGCGTGACGGTAAGCTGACTGCGGGCGAAATGCAGGGCGGTTGCTTCACCATCTC
 CAGCATCGGCGGCCTGGGTACTACCCACTTCGCGCGGATTGTGAACGCGCCGGAAGTGGCTATCCTC
 GCGGTTTCCAAGTCCGCGATGGAGCCGGTGTGGAATGGTAAAGAGTTCGTGCCGCGTCTGATGCTG
 CCGATTTCTCTCCTCGACCACCGCGTGATCGACGGTGCTGATGGTGCCGTTTCATTACCATCATT
 AACAAACACGCTGTCTGACATTGCGCGTCTGGTGATGTAAGTAAAAGAGCCGGCCCAACGGCCGGCT
 TTTTCTGGTAATCTCATGAATGTATTGAGGTTATTAGCGAATAGACAAATCGGTTGCCGTTTGTGT
 TAAAAATTGTTAACAATTTGTAAAAATACCGACGGATAGAACGACCCGGTGGTGGTTAGGGTATTA
 CTTACATACCTATGGATTTCTGGGTGCAGCAAGGTAGCAAGCGCCAGAATCCCCAGGAGCTTACA
 TAAGTAAGTGACTGGGGTGAGGGCGTGAAGCTAACGCCGCTGCGGCCTGAAAGACGACGGGTATG
 ACCGCCGGAGATAAATATATAGAGGTCATGATGAGTACTGAAATCAAACCTCAGGTCGTGGTACTT
GGGGCAGGCCCCGCAGGTTACTCCGCTGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAACCGTAATCG
TAGAACGTTACAACACCCTTGGCGGTGTTTGTCTGAACGTGGGTTGTATCCCTTCTAAAGCGTGCT
GCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAAGCGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACC
GAAAACTGACATTGACAAGATCCGCACCTGGAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCTGACCGGTGGTCT
GGCTGGCATGGCCAAAGGTCGTAAAGTGAAGGTGGTTAACGGTCTGGGTAATTTACCGGCGCTAA
CACCCTGGAAGTGAAGGCGAAACGGCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCCATCATCGCGGC
GGGTTCCCGTCCGATTCAGCTGCCGTTTATCCGCGATGAAGATCCGCGCGTATGGGACTCCACCGAC
GCGCTGGAACCTGAAATCTGTACCGAAACGCATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAA
ATGGGTACCGTATACCATGCGCTGGGTTAGAGATTGACGTGGTGGAATGTTGACCGAGGTTATC
CCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAAAGTCTTACCAACGCATCAGCAAGAAATTTAACCTGATG
CTGGAAGCCAAAGTGACTGCCGTTGAAGCGAAAGAAGACGGTATTTACGTTTCCATGGAAGGTAAA
AAAGCACCGGCGGAAGCGCAGCGTTACGACGCAGTGCTGGTCGCTATCGGCCGCGTACCGAATGGT

FIGURA 35

AAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGGCGTGGAAGTTGACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAAA
CAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCGC
ACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATCC
GAAAGTGATCCCATCCATCGCTACACTAAACCAGAAAGTGGCATGGGTCGGTCTGACCGAGAAAAG
AGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTAT
CGTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAAGTATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTTATCGGC
GGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGGG
CTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCTG
GCGGCGGAAGTGTTCTGAAGGCAGCATACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAACT
 TTTTCTTTCAGGAAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTATGCCTGATGTTTGAAGCTA
 TGCTACTGTTTATAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACA
 CTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTAAAAAAGCGGCTAACCACGCCGCTTT
 TTTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTTTCAAGAGAGACGTTTCGCATACTGCTGA
 CCGTTGCTCGTTATTCAGCCTGACAGTATGGTACTGTGCTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGAA
 CTTTCTCCCGAAAAACCTGACGTTGTTTCAAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCAG
 TTGCTGTTGATTCAAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTTCTT

FIGURA 35 (cont.)

		Sección 1					
EC-IpdA	(1)	1	10	20	30	40	52
KP-IpdA mutado	(1)	MMSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLETVIVERYNTLGGVCLNVGCI					
EC-IpdA	(53)	53	60	70	80	90	104
KP-IpdA mutado	(53)	PSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGEPKTDIDKIRTWKEKVINQLTGGLAG					
EC-IpdA	(105)	105	110	120	130	140	156
KP-IpdA mutado	(105)	MAKGRKVKVVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAGSRPIQLPFI					
EC-IpdA	(157)	157	170	180	190		208
KP-IpdA mutado	(157)	PHEDPRIWDSTDALELKEVPERLLVMGGGIIGLEMGTVYHALGSQIDVVEMF					
EC-IpdA	(209)	209	220	230	240	250	260
KP-IpdA mutado	(209)	DQVIPAADKDIVKVFTKRISKKFNLMLETKVTAVEAKEDGIYVTMEGKKAPA					
EC-IpdA	(261)	261	270	280	290	300	312
KP-IpdA mutado	(261)	EPQRYDAVLVAIGRVPNGKNLDAGKAGVEVDDRGFIRVDKQLRITNVPHIFAI					
EC-IpdA	(313)	313	320	330	340	350	364
KP-IpdA mutado	(313)	GDIVGQPMLAHKGVHEGHVAAEVIAGKKHYFDPKVIPSIAYTEPEVAWVGLT					
EC-IpdA	(365)	365	370	380	390	400	416
KP-IpdA mutado	(365)	EKEAKEKGISYETATFPWAASGRAIASDCADGMTKLIFDKEISHRVIGGAIVG					
EC-IpdA	(417)	417	430	440	450		468
KP-IpdA mutado	(417)	TNGGELLGEIGLAIEMGCDAEDIALTIHAHPTLHESVGLAAEVFEGSITDLP					
EC-IpdA	(469)	469	476				
KP-IpdA mutado	(469)	NPKAKKK-					
		NAKAKKK-					

FIG. 36

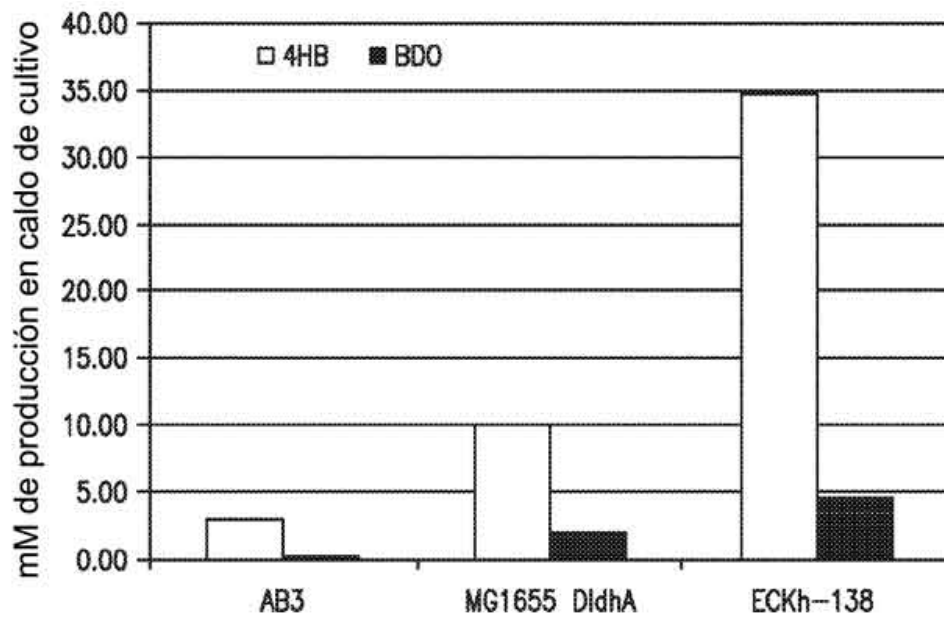


FIG. 37

*ataataatacatatgaaccatgacgagttacgggcctataagccaggcgagatatgatctatatcaatttctcatctataatgctttgtta
gtatctcgtcgccgacttaataaagagagagtagtgtgaaagctgacaaccctttgatcttttacttctgctgcaatggccaaagtgg
ccgaagaggcggtgtctataaaagcaacgaaacatccgcttaagactttctatctggcgattaccgccggtgtttcatctcaatcgattc
accactggcacaggcacaGAAGGTAGGTGTTACatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatcctattattat*

FIG. 38

AAGAGGTAAAAGAATAATGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAAT
 CACCGAGATCCTGGTCAAAGTGGCGACAAAGTTGAAGCCGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGG
 CGACAAAGCCTCTATGGAAGTCCGTCTCCGCAGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTT
 GCGGATAAAACCCAGACCGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCCGACGGTGCAGCAGACGCT
 GCACCTGCTCAGGCAGAAGAGAAGAAAGAAGCAGCTCCGGCAGCAGCACCAGCGGCTGCGGCGGC
 AAAAGACGTTAACGTTCCGGATATCGGCAGCGACGAAGTTGAAGTGACCGAAATCCTGGTGAAAGT
 TGGCGATAAAGTTGAAGCTGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGT
 TCCGGCTCCGTTTGCTGGCACCCTGAAAGAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAAAGTGTCTACCGG
 CTCGCTGATTATGGTCTTCGAAGTCGCGGGTGAAGCAGGCGCGGCAGCTCCGGCCGCTAAACAGGA
 AGCAGCTCCGGCAGCGGCCCCCTGCACCAGCGGCTGGCGTGAAAGAAGTTAACGTTCCGGATATCGG
 CGGTGACGAAGTTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGGGCGACAAAGTTGCCGCTGAACAGT
 CACTGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCTTCTATGGAAGTCCGGCGCCGTTTGACAGGCGTCGTGA
 AGGAACTGAAAGTCAACGTTGGCGATAAAGTGAAACTGGCTCGCTGATTATGATCTTCGAAGTTG
 AAGGCGCAGCGCTGCGGCAGCTCCTGCGAAACAGGAAGCGGCAGCGCCGGCACCGGCAGCAAAA
 GCTGAAGCCCCGGCAGCAGCACCAGCTGCGAAAGCGGAAGGCAAATCTGAATTTGCTGAAAACGA
 CGCTTATGTTACGCGACTCCGCTGATCCGCCGTCTGGCACGCGAGTTTGGTGTTAACCTTGCGAAA
 GTGAAGGGCACTGGCCGTAAAGGTCTATCCTGCGCGAAGACGTTACAGGCTTACGTGAAAGAAGCT
 ATCAAACGTGCAGAAGCAGCTCCGGCAGCGACTGGCGGTGGTATCCCTGGCATGCTGCCGTGGCCG
 AAGGTGGACTTCAGCAAGTTTGGTGAAATCGAAGAAGTGGAAGTGGGCCGATCCAGAAAATCTCT
 GGTGCGAACCTGAGCCGTAAGTGGGTAATGATCCCGCATGTTACTCACTTCGACAAAACCGATATCA
 CCGAGTTGGAAGCGTTCCGTAAACAGCAGAACGAAGAAGCGGCGAAACGTAAGCTGGATGTGAAG
 ATCACCCCGTTGTCTTCATCATGAAAGCCGTTGCTGCAGCTCTTGAGCAGATGCCTCGCTTCAATAG
 TTCGCTGTCGGAAGACGGTCAGCGTCTGACCCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGTGGCGGTGGA
 TACCCCGAACGGTCTGTTGTTCCGGTATTCAAAGACGTCAACAAGAAAGGCATCATCGAGCTGTCT
 CGCGAGCTGATGACTATTTCTAAGAAAGCGCGTGACGGTAAGCTGACTGCGGGCGAAATGCAGGG
 CGGTTGCTTCACCATCTCCAGCATCGCGGCCTGGGTACTACCCACTTCGCGCCGATTGTGAACGCG
 CCGGAAGTGCTATCCTCGGCGTTTCCAAGTCCGCGATGGAGCCGGTGTGGAATGGTAAAGAGTTC
 GTGCCGCGTCTGATGCTGCCGATTTCTCTCTCTTCGACCACCGCGTGATCGACGGTGCTGATGGTG
 CCCGTTTCATTACCATCATTAAACAACACGCTGTCTGACATTCGCCGTCTGGTGATGTAAGTAAAGAG
 CCGGCCCCAACGGCCGGCTTTTTCTGGTAATCTCATGAATGTATTGAGGTTATTAGCGAATAGACAA
 ATCGGTTGCCGTTTGTTAAGCCAGGCGAGATATGATCTATATCAATTTCTCATCTATAATGCTTTGTTA
 GTATCTCGTCGCCGACTTAATAAAGAGAGAGTTAGTCTTCTATATCACAGCAAGAAGGTAGGTGTTA
 CATGATGAGTACTGAAATCAAACTCAGGTCGTGGTACTTGGGGCAGGCCCCGAGGTTACTCTGC
 AGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAACCGTCATCGTAGAACGTTACAGCACCTCGGTGGT
 GTTTGCTGAACGTGGGTGTATCCCTTCAAAGCGCTGCTGCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAAG
 CGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACCGAAAAGTACATTGACAAGATCCGCA
 CCTGGAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCTGACCGGTGGTCTGGCTGGCATGGCCAAAGGTCTGTAAG
 TGAAGGTGGTTAACGGTCTGGGTAAATTTACCGGCGCTAACACCCTGGAAGTGAAGGCGAAAACG
 GCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCCATCATCGCGCGGGTCCCGTCCGATTCAGCTGCCGTT
 TATCCCGCATGAAGATCCGCGCGTATGGGACTCCACCGACGCGCTGGAAGTGAATCTGTACCGAA
 ACGCATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAAATGGGTACCGTATACCATGCGCTGGG
 TTCAGAGATTGACGTGGTGGAATGTTGACCAGGTTATCCCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAA
 AGTCTTACCAAACGCATCAGCAAGAAATTTAACCTGATGCTGGAAGCCAAAGTGAAGTCCGTTGAA
 GCGAAAGAACGCGTATTTACGTTTCATGGAAGGTAAAAAGCACCGGCGGAAGCGCAGCGTTA
 CGACGCGAGTGTGGTCTATCGGCCGCGTACCGAATGGTAAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGG
 CGTGGAAGTTGACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAA

FIGURA 39

ACAAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCG
 CACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATC
 CGAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTAAACCAGAAGTGGCATGGGTCTGACCGAGAAAG
 AAGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTA
 TCGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAAGTATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTTATCGG
 CGGCGCGATTGTCCGCACCAACGGCGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGG
 GCTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCT
 GGC GGCGGAAGTGTTCAAGGCAGCATCACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAAC
 TTTTCTTTT CAGGAAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTTATGCCTGATGTTTAGAACT
 ATGTCACTGTT CATAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCAC
 ACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTA AAAAAGCGGCTAACCACGCCGCTT
 TTTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTT CAGAGAGACGTTCTGCATACTGCTG
 ACCGTTGCTCGTTATTCAGCCTGACAGTATGGTTACTGTCGTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGA
 ACTTTCTCCCGAAAAACCTGACGTTGTT CAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCAC
 GTTGCTGTTGATT CAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTTCTTAAACACCTGGCGCTGCTCTGGTGATGCG
 GACTGAATACGCTCACGCGCTGCGTCTTCTGCTGCTGGTTCTGCGGGTTAGTCTGCATTTTCTCGCG
 AACCGCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGAATGCGCTCACGCGCTGCCTCTCTTCGCTGCTG
 GATCTTCGGGTTAGTCTGCATTCTCTCGCGAACTGCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGATAA
 CGCTGACGAGCGGCGTCCTTTTGTTGCTGGGT CAGTGGTTGGCGACGGCTGAAGTCGTGGAAGTCG
 TCATAGCTCCCATAGTGTT CAGCTTCATTAACCGCTGTGCCGCTGCCTGACGTTGGGTACCTCGTGT
 AATGACTGGTGCGGCGTGTTGTTGCTGAAACTGATTTGCTGCCGCCTGACGCTGGCTGTCGCGC
 GTTGGGGCAGGTAATTGCGTGCGCTCATTCCGCCGTTGACATCGGTTTGATGAAACCGCTTTGCCA
 TATCCTGATCATGATAGGGCACACCATTACGGTAGTTTGGATTGTGCCGCCATGCCATATTCTTATCA
 GTAAGATGCTCACCGGTGATACGGTTGAAATTGTTGACGTCGATATTGATGTTGTCGCCGTTGTGTT
 GCCAGCCATTACCGTCACGATGACCGCCATCGTGGTGATGATAATCAT

FIGURA 39 (cont.)

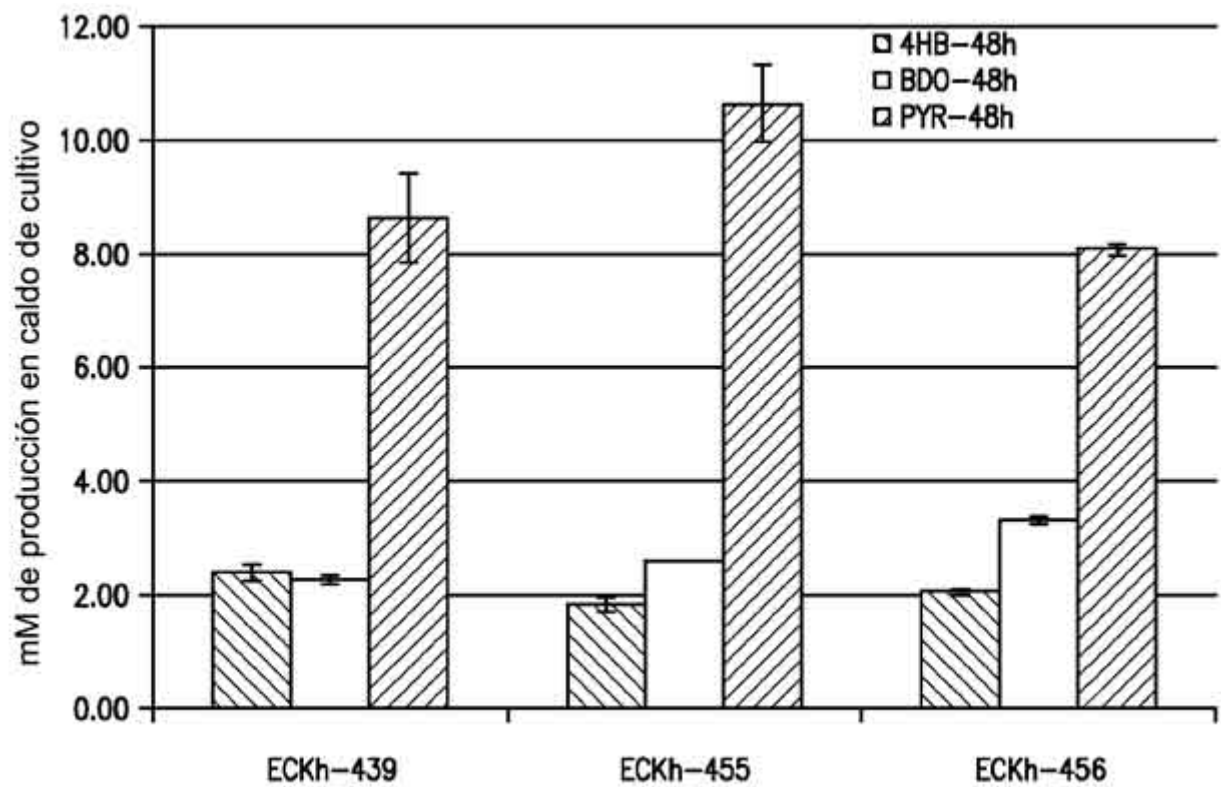


FIG. 40

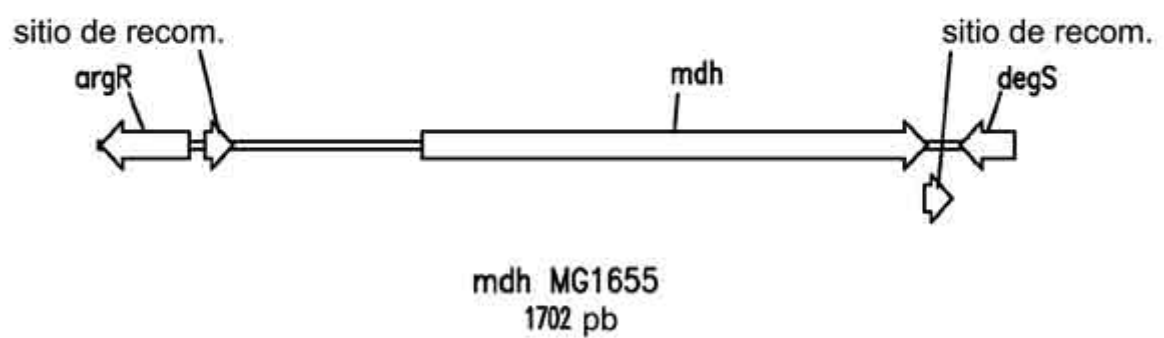


FIG. 41A

```

                                FRT
                                ~~~~~
                                AS-mdh-Kan
                                ~~~~~
                                XbaI
                                ~~~~~
1  CAAAAAACCG GAGTCTGTGC TCCGGTTTTT TATTATCCGC TAATCAATTA CATATGAATA TCCTCCTTAG TTCCTATTCC GAAGTTCCTA TTCTCTAGAA
   GTTTTTTGGC CTCAGACAG AGGCCAAAAA ATAATAGGCG ATTAGTTAAT GTATCTTAT AGGAGGAATC AAGGATAAGG CTTCAGGAT AAGAGATCTT
   FRT
   ~~~~~
101 AGTATAGGAA CTTCGGCGCG CCTACCTGTG ACGGAAGATC ACTTCGCACA ATAAATAAAT CCTGGTGTC CTGTTGATAC CGGAAGGCC TGGGCCAACT
   TCATATCCTT GAAGCGCGCG GGATGGACAC TGCCTTCIAG TGAAGGCTCT TATTTATTTA GGACCACAGG GACAACTATG GCCCTTCGGG ACCCGTTGA
201 TTTGGCGAAA ATGAGACGTT GATCGGCACG TAAGAGGTTT CAATTTTCAC CATATGAAA TAAGATCACT ACCGGGCGTA TTTTGTAGT TGTCTAGATT
   AAACCGCTTT TACTCTGCAA CTAGCCGTGC ATTCTCCAAG GTTCAAAGTG GTATTACTTT ATTCTAGTGA TGGCCCGCAT AAAAACTCA ACAGCTCTAA
   Cat
   ~~~~~
   MetGluLys LysIleThr GlyTyrThrThr ValAspIle SerGlnTrp HisArgLysGlu HisPheGlu AlaPheGln
301 TTCAGGAGCT AAGGAAGCTA AAATGGAGAA AAAATCACT GGATATACCA CCTTGATAT ATCCCAATGG CATCGTAAAG AACATTTTGA GGCATTTTCA
   AAGTCTCGA TTCCTTCGAT TTTACCTCTT TTTTGTAGTA CCTATATGCT GGCACTATA TAGCGTTACC GTACCATTTT TTGTAAACT CCGTAAAGTC
   Cat
   ~~~~~
   SerValAlaGln CysThrTyr AsnGlnThr ValGlnLeuAsp IleThrAla PheLeuLys ThrValLysLys AsnLysHis LysPheTyr ProAlaPheile
401 TCAGTTGCTC AATGTACCTA TAACCAGACC GTTCAGCTGG ATATTACGGC CTTTTTAAAG ACGTAAAGA AAAATAAGCA CAAGTTTTAT CCGGCCCTTA
   AGTCAACGAG TTACATGGAT ATTGGTCTGG CAAGTCGACC TATAATGCGC GAAAAATTC TGGCATTTCT TTTTATTGCT GTTCAAAATA GGCCGAAAT
   Cat
   ~~~~~
   IHisIleLeu AlaArgLeu MetAsnAlaHis ProGluLeu ArgMetAla MetLysAspGly GluLeuVal IleTrpAsp SerValHisPro CysTyrThr
501 TTCATTTCTT TCGCCGCTG ATGAATGCTC ATCCGGAATT ACGTATGGCA ATGAAAGACG GTGAGCTGCT GATATGGGAT AGTGTTCACC CTGTGTACAC
   AAGTGTAAGA ACGGGCGGAC TACTTACGAG TAGGCCTTAA TGCATACCTT TACTTCTGCG CACTCGACCA CTATACCTTA TCACAAGTGG GAACAATGTG
   Cat
   ~~~~~
   ValPheHis GluGlnThrGlu ThrPheSer SerLeuTrp SerGluTyrHis AspAspPhe ArgGlnPhe LeuHisIleTyr SerGlnAsp ValAlaCys
601 CGTTTTCCAT GAGCAACTG AAACGTTTTC ATCGCTCTGG AGTGAATACC ACGACGATTT CCGGCAGTTT CTACACATAT ATTGCAAGA TGTGCGTGT
   GCAAAAGGTA CTGTTTGAC TTTGCAAAAG TAGCGAGACC TCCTTATGCG TGCTGCTAAA GGCCGTCAA GATGTGTATA TAAGCGTTCT ACACCGCACA
   Cat
   ~~~~~
   TyrGlyGluAsn LeuAlaTyr PheProLys GlyPheIleGlu AsnMetPhe PheValSer AlaAsnProTrp ValSerPhe ThrSerPhe AspLeuAsnVal
701 TACGGTGAAA ACCTGGCCTA TTCCCTTAA GGGTTTATG AGAATATGTT TTTCTCTCA GCCAATCCCT GGGTGAATTT CACCACTTTT GATTITAAAC
   ATGCCACTTT TGGACCGGAT AAAGGATTT CCAAAATAC TCTTATACAA AAAGCAGAGT CGGTTAGGGA CCCACTCAA GTGTCAAAA CTAATTTTC
   Cat
   ~~~~~
   ValAsnMet AspAsnPhe PheAlaProVal PheThrMet GlyLysTyr TyrThrGlnGly AspLysVal LeuMetPro LeuAlaIleGln ValHisHis
801 TGGCCAATAT GGCAAACTTC TTGCCCCCG TTTTACCAT GGGCAATAT TATACGCAAG GCGACAAAGT GCTGATGCG CTGGCGATTC AGGTTTCATCA
   ACCGTTTATA CTGTTTGAAG AAGCGGGGGC AAAAGTGGA CCCGTTTATA ATATGCGTTC CGCTGTTCOA CGACTACGGC GACCGCTAAG TCAAGTAGT
   Cat
   ~~~~~
   AlaValCys AspGlyPheHis ValGlyArg CysLeuMet AsnThrThrVal LeuArg** *
901 TGCCGTTTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG ATGCTTAATG AATACAACAG TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGCGCTAA GGCGCGCCAT TTAATGAAG
   ACGGCAACA CTACCGAAGG TACAGCCGTC TACGAATTAC TTATGTTGTC ATGACGCTAC TCACCGTCCC GCCCGCATT CCGCGCGGTA AATTTACTTC
   FRT
   ~~~~~
1001 TTCCTATTCC GAAATTCCTA TTCTCTAGAA AGTATAGGAA CTTCGAAGCA GCTCCAGCCT ACACCTTCT TCAGGCTGA CTGTTTGAT AAAAATTCAT
   AAGGATAAGG CTTCAGGAT AAGAGATCTT TCATATCCTT GAAGCTTCTT CGAGTCTCGA TGTGGGAAGA AGTCCCGACT GACAAACGTA TTTTAAAGTA
   ~~~~~
                                S-mdh-Kan
1101 CTGTATGCAC AATA
   GACATACGTG TTAT
   ~~~~~

```

FIG. 41B

TTATTTGGTGATATTGGTACCAATATCATGCAGCAAACGGTGCAACATTGCCGTGTCTCGTTGCTCTA
 AAAGCCCCAGGCGTTGTTGTAACCAAGTCGACCAAGTTTATGTCATCTGCCACTGCCAGAGTCGTGAG
 CAATGTCATGGCTCGTTCCGCTAAAGCTTGCAAGTTGATGTTGGTCTGCCGTTGCATCACTTTTCGCCG
 GTTGTGTTAATGTTGCTAATTGATAGCAATAGACCATCACCGCCTGCCCCAGATTGAGCGAAGG
 ATAATCCGCCACCATCGGCACACCAGTAAGAACGTCAGCCAACGCTAACTCTTCGTTAGTCAACCCG
 GAATCTTCGCGACCAAACACCAGCGCGGCATGGCTCATCCATGAAGATTTTCTCTAACAGCGGCA
 CCAGTTCAACTGGCGTGGCGTAGTAATGATATTTCCGCCGACTGCGCGCAGTGGTGGCGACAGTGA
 AATCGACATCGTGTAACGATTACGCCAATGTCGGGAAAACCTTAATATTATCAATAATATCACCAGAT
 CCATGTGCGACCCAGCGGGTGGCTGGCTCCAGGTGTGCCTGACTATCGACAATCCGCAGATCGCTA
 AACCCCATCGTTTTATTGCCCGCGCGCTGCCCAATATTTCTGCTCTGGCGGGTGGCGACCAGAAT
 AATCGTTATACGCATATTGCCACTCTTCTTGATCAAATAACCGCGAACCAGGGTGATCACTGTCAACTT
 ATTACGCGGTGCGAATTTACAAATCTTAACGTAAGTCGAGAAAAAGCCCTTACTTAGCTTAAAAA
 AGGCTAACTATTTCTGACTGTACTAACGGTTGAGTTGTTAAAAAATGCTACATATCCTTCTGTTTA
 CTTAGGATAATTTTATAAAAAATAAATCTCGACAATTGGATTACCCACGTTTATTAGTTGTATGATGC
 AACTAGTTGGATTATTAATAAATGTGACGAAAGCTAGCATTAGATACGATGATTCATCAAAGTGT
 TAACGTGCTACAATTGAACTTGATATATGTCAACGAAGCGTAGTTTTATTGGGTGTCCGGCCCTCTT
 AGCCTGTTATGTTGCTGTTAAAAATGGTTAGGATGACAGCCGTTTTTGACACTGTCGGGTCTGAGGG
 AAAGTACCCACGACCAAGCTAATGATGTTGTTGACGTTGATGGAAAGTCATCAAGAACGCAATTAC
 GTACTTTAGTCATGTTACGCCGATCATGTTAATTTGCAGCATGCATCAGGCAGGTACAGGGACTTTTGT
 ACTTCTGTTTCGATTTAGTTGGCAATTTAGGTAGCAAACGAATTCATCGGCTTTACCACCGTCAAAA
 AAAACGGCGCTTTTAGCGCCGTTTTATTTTCAACCTTATTTCCAGATACGTAACCTATCGTCCGTT
 GTAACCTCTTTACTGGCTTTCATTTTCGGCAGTGAAAACGCATACCAGTCGATATTACGGGTCAAAA
 CATCATGCCGGCCAGCGCCACCACCAGCACACTGGTTCCCAACAACAGCGCGCTATCGGCAGAGTTG
 AGCAGTCCCCACATCACACCATCCAGCAACAACAGCGCGAGGGTAAACAACATGCTGTTGCACCAAC
 CTTTCAATACCGCTTGCAAATAAATACCGTTCATTATCGCCCCAATCAGACTGGCGATTATCCATGCC
 ACGGTAAAACCGGTATGTTCAGAAAAGCGCCAGCAAGAGCAAATAAAACATCACCAATGAAAGCCCC
 ACCAGCAAATATTGCATTGGGTGTAAACGTTGCGCGGTGAGCGTTTCAAAAACAAAGAACGCCATA
 AAAGTCAGTGCAATCAGCAGAATGGCGTACTTAGTCGCCCGGTGAGTTAATTGGTATTGATCGGCTG
 GCGTCGTTACTGCGACGCTAAACGCCGGGAAGTTTTCCAGCCGGTATCATTGCCTGAAGCAAAACG
 CTCACCGAGATTATTAGCAAACCAGCTGCTTTGCCAGTGCGCTGAAAACCTGACTCGCTAACTCCC
 GTTTGGCTGGTAGAAAATCACCTAAAAAAGTGGGATGCGGCCAGTTGCTGGTTAAGGTCAATTCGCT
 ATTACGCCCCGCCAGGCACCACAGAAAGATCGCCGGTACCGCTTAAATTCAGGGCCATATTACGCTTC
 AGGTTCTGCTTCCGCCAGTCCCCTTCAGGTAAGGGATATGCACGCCCTGCCCGCCTTGCTCTAACCC
 GGTGCCGGGTTCAATGGTCAGCGCCGTTCCGTTAACTTCAGGCGCTTTCACCACACCAATACCACGC
 GCATCCCCGACGCTAATCACAATAAATGGCTTGCTAAGGTGATATTTGGCGCGTTGAGTTCGCTAA
 GACGCGAAACATCGAAATCGGCTTTTAACTGTTAAATCACTGTGCCAGACCTGACCGGTATAAATCCC
 TATCTTGCGTTCTCCACGTTCTGATTGCCATCAACCATCAATGACTCAGGTAACCAAAAAATGGATAA
 AACTTCGTTTCCGCTGCAGGGTTTTAT

FIGURA 42

AAGCCACAGCAGGATGCCACTGCAACAAAGGTGATCACACCGGAAACGCGATGGAGAATGGACG
 CTATCGCCGTGATGGGGAACCGGATGGTCTGTAGGTCCAGATTAAACAGGTCTTTGTTTTTCACATTT
 CTTATCATGAATAACGCCACATGCTGTTCTTATTATCCCTGGGGACTACGGGCACAGAGGTTAACT
 TTCTGTTACCTGGAGACGTCGGGATTTCTTCTCCGGTCTGCTTGCGGGTGAGACAGCGTCCTTTCT
 ATAAGTGCAGCATGCAAAACACTGCTTCCAGATGCGAAAACGACACGTTACAACGCTGGGTGGCT
 CGGGATTGCAGGGTGTCCGGAGACCTGGCGGCAGTATAGGCTGTTACAAAATCATTACAATTAA
 CCTACATATAGTTTGTGGGTTTTATCCTGAACAGTGATCCAGGTCACGATAACAACATTTATTTAAT
 TTTAATCATCTAATTTGACAATCATTCAACAAAGTTGTTACAAAACATTACCAGGAAAAGCATATAAT
 GCGTAAAAGTTATGAAGTCGGTATTTACCTAAGATTAACTTATGTAACAGTGTGGAAGTATTGACC
 AATTCATTGGGACAGTTATTAGTGGTAGACAAGTTAATAATTGCGATTGCTAAGTACTTGATTGCG
 CATTTATTCGTATCAATGGATCCTTTACCTGCAAGCGCCAGAGCTCTGTACCCAGGTTTTCCCTCT
 TTCACAGAGCGGCGAGCCAAATAAAAAACGGGTAAAGCCAGGTTGATGTGCGAAGGCCAAATTTAA
 GTTCCGGCAGTCTTACGCAATAAGGCGCTAAGGAGACCTTAAATGGCTGATACAAAAGCAAACTC
 ACCCTCAACGGGGATACAGCTGTTGAAGTGGATGTGCTGAAAGGCACGCTGGGTCAAGATGTTATT
 GATATCCGTACTCTCGGTTCAAAAGGTGTGTTACCTTTGACCCAGGCTTCACTTCAACCGCATCTG
 CGAATCTAAAATTACTTTTATTGATGGTGAAGGATTTTGTGTCACCGCGGTTTTCCGATCGATC
 AGCTGGCGACCGATTCTAACTACCTGGAAGTTTGTACATCTGCTGAATGGTGAACCAACGACTCA
 GGAACAGTATGACGAATTTAACTACGGTGACCCGTCATACCATGATCCACGAGCAGATTACCCGT
 CTGTTCCATGCTTTCCGTCGCGACTCGCATCCAATGGCAGTCATGTGTGGTATTACCGGCGCGCTGG
 CGGCGTTCTATCACGACTCGCTGGATGTTAACAATCCTCGTCACCGTGAAATTGCCGCGTTCCTCTG
 CTGTGAAAATGCCGACCATGGCCGCGATGTGTTACAAGTATTCATTGGTCAGCCATTGTTTACCC
 GCGCAACGATCTCTCTACGCCGGTAACTTCTGAATATGATGTTCTCCACGCCGTGCGAACCGTATG
 AAGTTAATCCGATTCTGGAACGTGCTATGGACCGTATTCTGATCCTGCACGCTGACCATGAACAGAA
 CGCCTCTACCTCCACCGTGCGTACCGCTGGCTCTTCGGGTGCGAACCCGTTTGCTGTATCGCAGCA
 GGTATTGCTTACTGTGGGGACCTGCGCACGGCGGTGCTAACGAAGCGGCGCTGAAAATGCTGGAA
 GAAATCAGCTCCGTAAACACATTCCGGAATTTGTTGCTCGTGCGAAAGACAAAAATGATTCTTCCG
 CCTGATGGGCTTCGGTCACCGCGTGTACAAAATACGACCCGCGCGCCACCGTAATGCGTGAAACC
 TGCCATGAAGTGCTGAAAGAGCTGGGCACGAAGGATGACCTGCTGGAAGTGGCTATGGAGCTGGA
 AAACATCGCGCTGAACGACCCGTACTTTATCGAGAAGAACTGTACCCGAACGTCGATTTCTACTCT
 GGTATCATCCTGAAAGCGATGGGTATTCCGTCTTCATGTTACCGTCATTTTCGCAATGGCACGTAC
 CGTTGGCTGGATCGCCCACTGGAGCGAAATGCACAGTGACGGTATGAAGATTGCCCGTCCGCGTCA
 GCTGTATACAGGATATGAAAAACGCGACTTTAAAGCGATATCAAGCGTTAATGTTGATTGCTAAG
 TTGTAATATTTTAACCCGCCGTTATATGGCGGGTGTATTTTATATGCCTAAACACAAAAAATTGT
 AAAAAATAAATCCATTAACAGACCTATATAGATATTTAAAAAGAATAGAACAGCTCAAATTATCAGC
 AACCCAATACCTTCAATTAATAAATTCATGGTAGTCGATTTATAACCTATGAAAATGACGTCTATCT
 ATACCCCCCTATATTTTATTCATCATACAACAAATTCATGATACCAATAATTTAGTTTTGCATTTAATAA
 AACTAACAATATTTTAAAGCAAACTAAAACTAGCAATAATCAAATACGATATTCTGGCGTAGCTAT
 ACCCTATTCTATATCCTTAAAGGACTCTGTTATGTTTAAAGGACAAAAAACATTGGCCGCACTGGCC
 GTATCTCTGCTGTTCACTGCACCTGTTTATGCTGCTGATGAAGGTTCTGGCGAAATTCATTTAAGGG
 GGAGGTTATTGAAGCACCTTGTAATTCATCCAGAAGATATTGATAAAAACATAGATCTTGACAA
 GTCACGACAACCCATATAAACGGGAGCATCATAGCAATAAAGTGGCCGTCGACATTCGCTTGATCA
 ACTGTGATCTGCCTGCTTCTGACAACGGTAGCGGAATGCCGGTATCCAAAGTTGGCGTAACCTTCGA
 TAGCACGGCTAAGACAACCTGGTGCTACGCCTTTGTTGAGCAACACCAGTGCAGGCGAAGCAACTGG
 GGTCGGTGACGACTGATGGACAAAAATGACGGTAACATCGTATTAGGTTAGCCGCGCCAGATCT
 TGACCTGGATGCAAGCTCATCAGAACAGACGCTGAACTTTTTCGCTGGAT

FIGURA 43

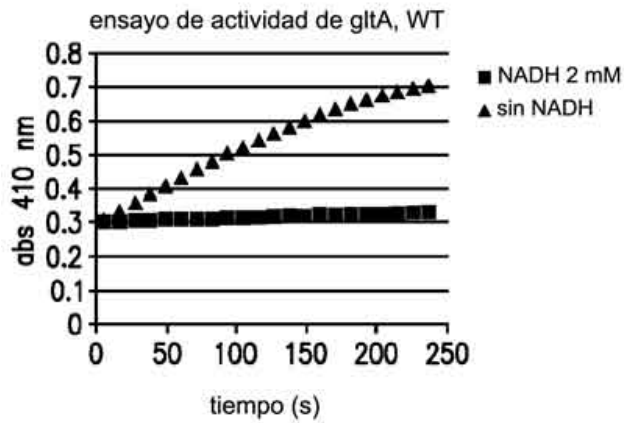


FIG. 44A

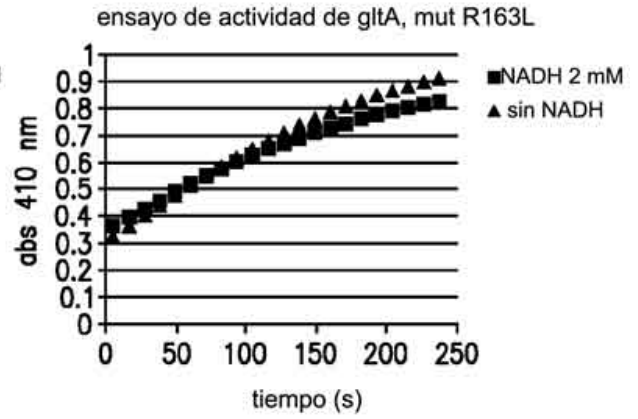


FIG. 44B

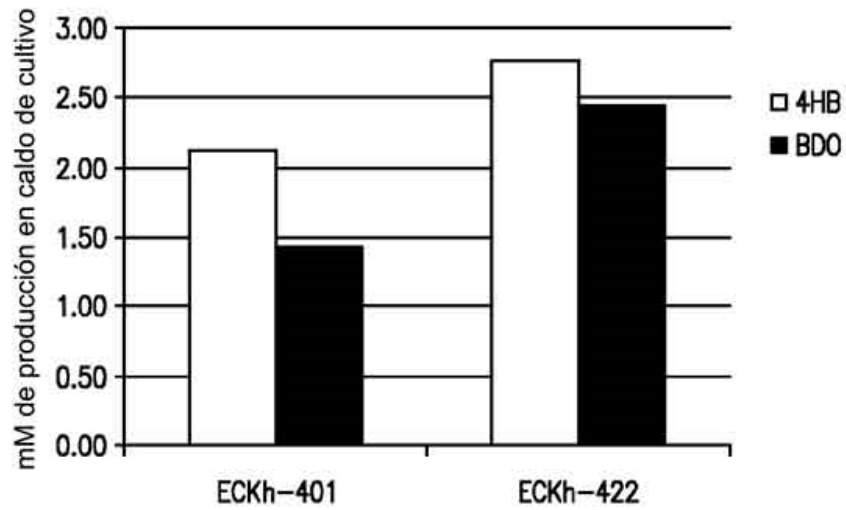


FIG. 45

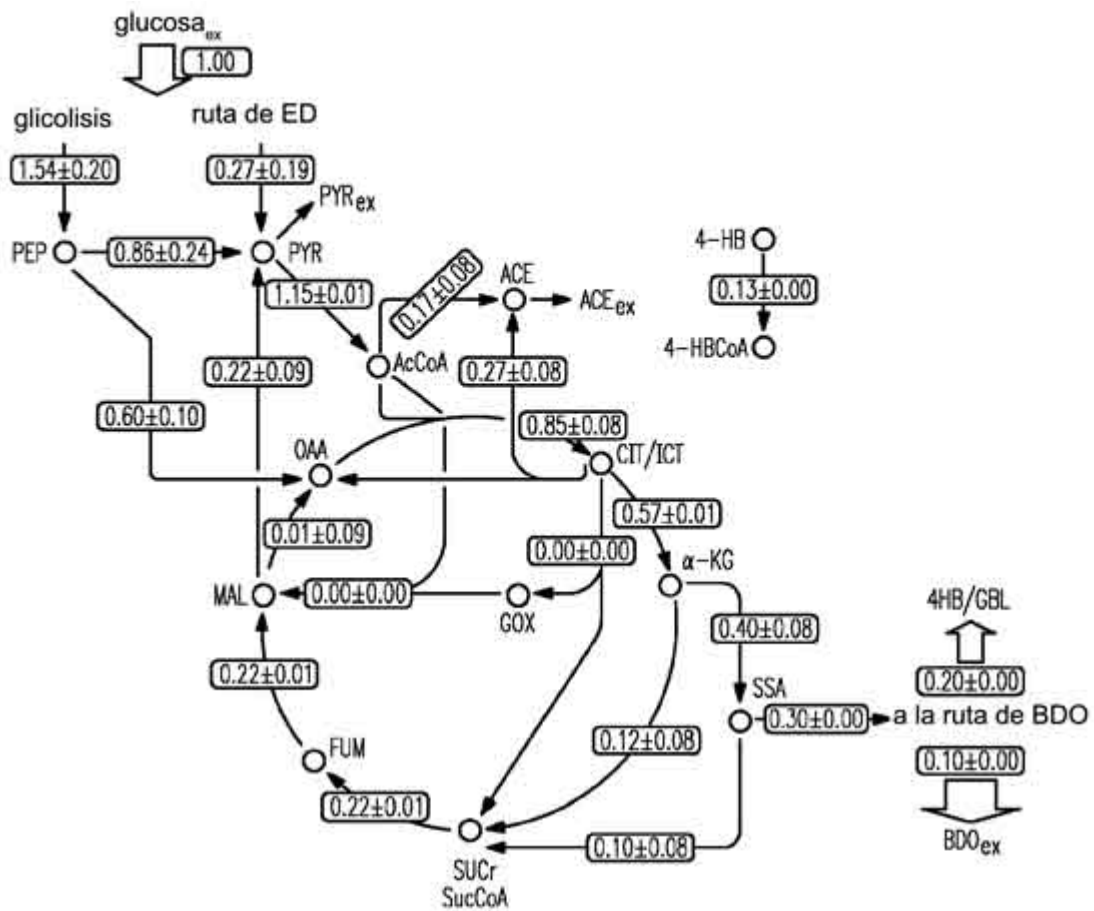


FIG. 46

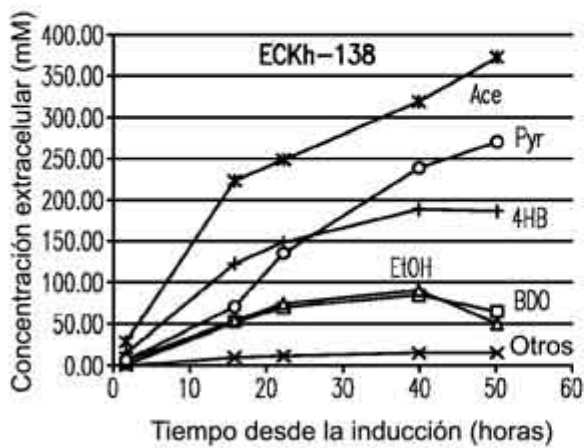


FIG. 47A

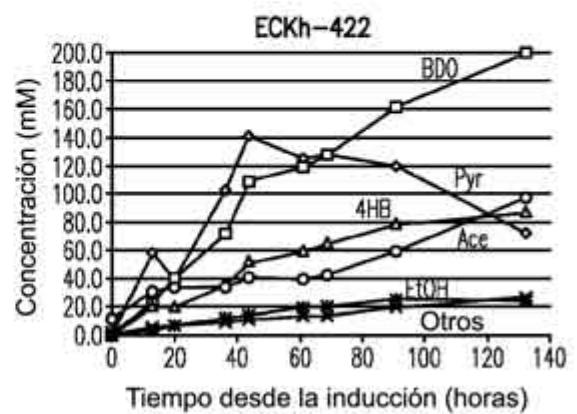


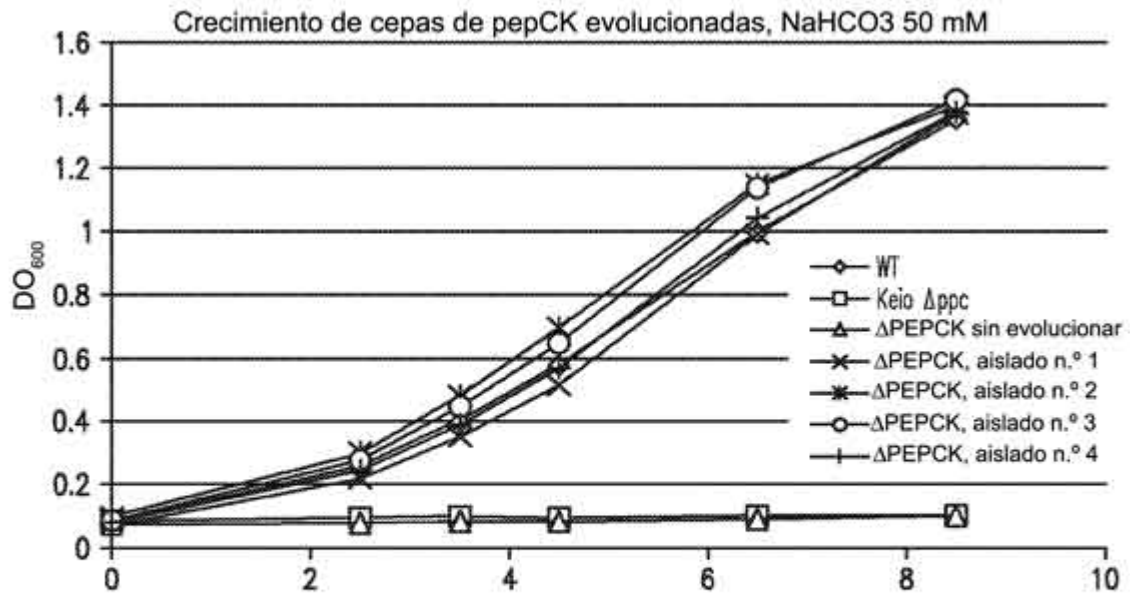
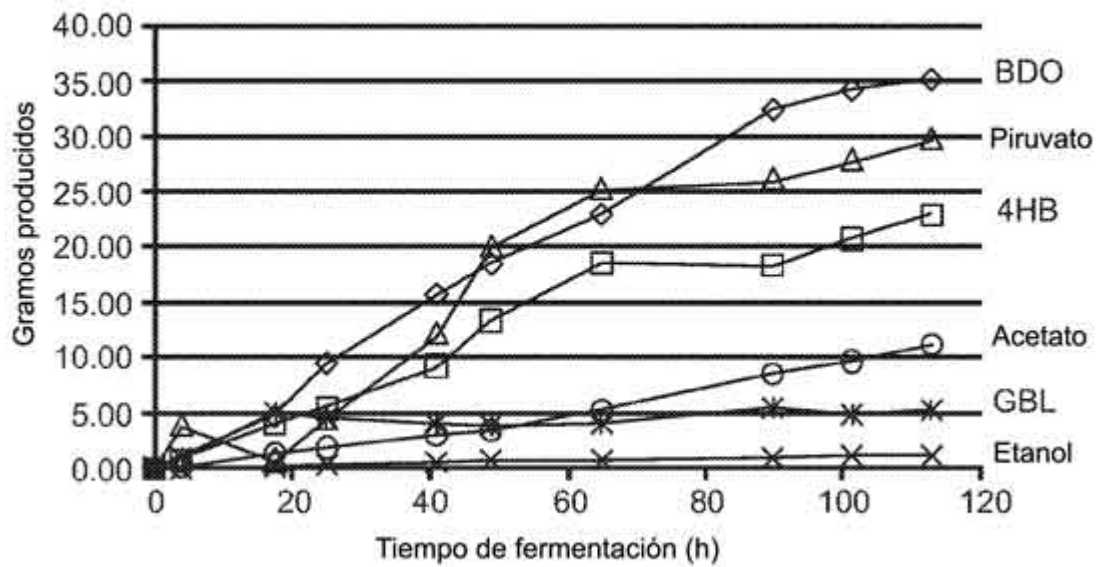
FIG. 47B

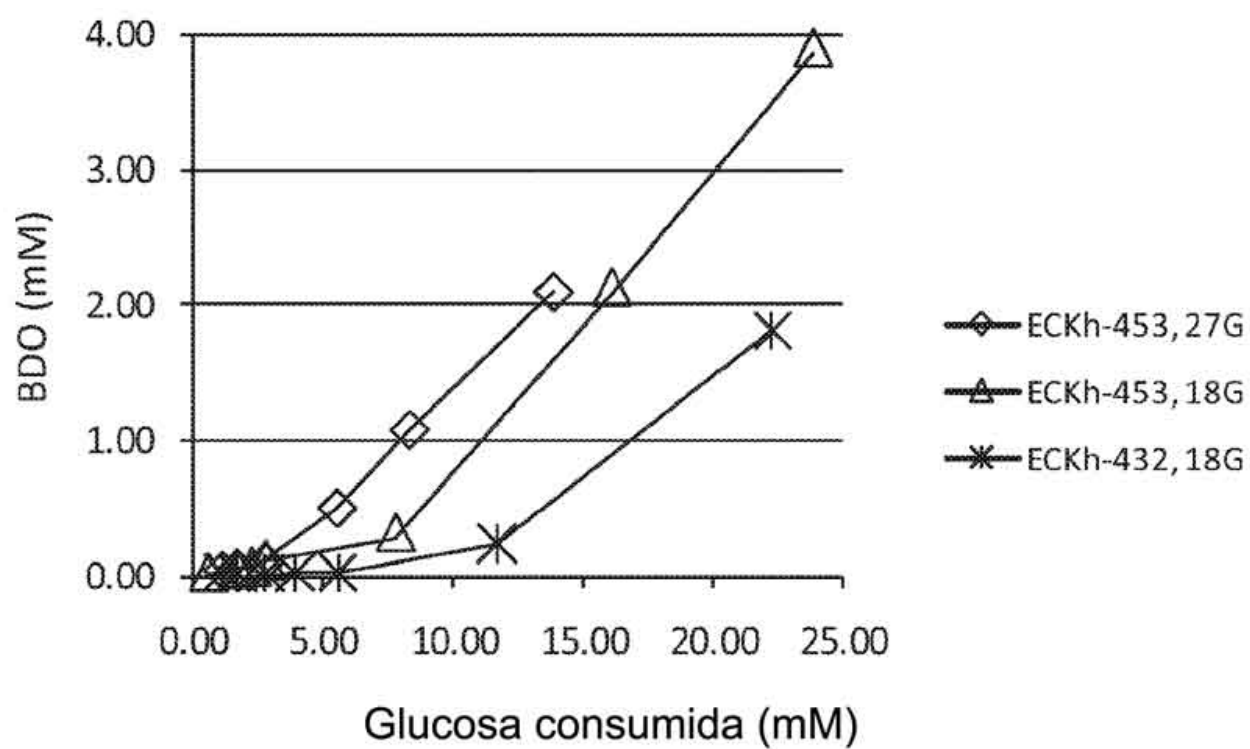
CGCGATGTCGACGTCACGAAACTGAAAAAACCGCTCTACATTCTGGCGACTGCTGATGAAGAAACC
 AGTATGGCCGGAGCGCGTTATTTGCGGAACTACCGCCCTGCGCCCGATTGCGCCATCATTGGCG
 AACCGACGTCACTACAACCGGTACGCGCACATAAAGGTCATATCTCTAACGCCATCCGTATTCAGGG
 CCAGTCGGGGCACTCCAGCGATCCAGCACGCGGAGTTAACGCTATCGAACTAATGCACGACGCCAT
 CGGGCATATTTTGCAATTGCGCGATAACCTGAAAGAACGTTATCACTACGAAGCGTTTACCCTGCCA
 TACCCTACGCTCAACCTCGGGCATATTACGGTGCGGACGCTTCTAACCGTATTTGCGCTTGCTGTGA
 GTTGTCATATGGATATTCGTCCGCTGCTGGCATGACACTCAATGAACTTAATGGTTTGCTCAACGATG
 CATTGGCTCCGGTGAGCGAACGCTGGCCGGGTCTGTGACGGTCGACGAGCTGCATCCGCCGATCC
 CTGGCTATGAATGCCACCGAATCATCACTGGTTGAAGTGTTGAGAAATTGCTCGGAGCAAAAA
 CCGAAGTGGTGAATACTGTACCGAAGCGCCGTTTATTCAAACGTTATGCCGACGCTGGTGTGGG
 GCCTGGCTCAATTAATCAGGCTCATCAACCTGATGAATATCTGGAACACGTTTATCAAGCCCACCC
 GCGAACTGATAACCCAGGTAATTACCATTTTTGCTGGCATTAAACGTTAGGCCGGATAAGGCGCTC
 GCGCCGCATCCGGCGCTGTTGCCAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATGCTTGCGCATC
 TTATCCGACCTACAGTGACTCAAACGATGCCAACCCTAGGCCGGATAAGGCGCTCGCGCCGCATCC
 GGCATGTTGCCAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATACTTGCGCATCTTATCCGACCG
 ACAGTGACTCAAACGATGCCAACCCTAGGCCGGATAAGGCGCTCGCGCCGCATCCGGCACTGTTG
 CCAAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATACTTGCGCATCTTATCCGACCTACACCTTGGT
 GTTACTTGGGGCGATTTTTAACATTTCCATAAGTTACGCTTATTTAAAGCGTCGTGAATTAATGAC
 GTAAATTCCTGCTATTTATTCGTTTGCTGAAGCGATTTGCGAGCATTTGACGTCACCGCTTTTACGTG
 GCTTTATAAAAGACGACGAAAAAGCAAGCCCGAGCATATTCGCGCCAATGCTAGCAAGAGGAGAAG
 TCGACATGACAGACTTAAATAAAGTGGTAAAGAACTTGAAGCTCTTGGTATTTATGACGTAAAGA
 AGTTGTTTACAACTCAAGCTACGAGCAATTGTTGGAAGAAGAACTAAACCAGGTTTAGAAGGCTTT
GAAAAAGGTACTTTAACTACGACTGGTGAGTGGCAGTAGATACAGGTATCTTCACAGGTCGTTCTC
CAAAAGATAAATATATCGTGTTAGATGAAAAAACCAAGATACTGTTTGGTGGACATCTGAAACAGC
AAAAAACGACAACAAGCCAATGAACCAAGCTACATGGCAAAGCTTAAAGACTTGGTAACCAACCA
GCTTCTCGTAAACGCTTATTTGTAGTTGATGGTTTCTGTGGTGCGAGCGAACACGACCGTATTGCA
GTACGTATTGCTACTGAAGTAGCGTGGAAGCACATTTGTAAAAAATATGTTTATTCGCCAACTGA
AGAACAACTCAAAAATTTGAACCAGATTTGTTGTAATGAATGGTTCTAAAGTAACCAATCCAACT
GGAAAGAACAAGGTTTAAATTCAGAAAACCTTTGTTGCTTCACTTGACTGAACGCATTCAATTAATC
GGTGGTACTTGGTACGGCGGTGAAATGAAAAAGGTATGTTCTCAATCATGAATACTTCTACCAC
TTAAAGGTGTTGGTGCAATGCACTGCTCAGCTAACGTTGGTAAAGATGGCGATGTAGCAATCTTCTT
CGGCTTATCTGGCACAGGTAACCAACCTTTCAACGGATCCAAACGTTGAATTAATCGGTGACGAT
GAACACGGCTGGGATGATGTGGGTATCTTAACTTTGAAGGTGGTTGCTATGCGAAAACCATTCACC
TTTCAGAAGAAAATGAACCAGATATTTACCGCGCTATCCGTCGCGACGCATTATTAGAAAACGTGGT
IGTTTCGTGCAGATGGTTCTGTTGATTCGATGATGGTTCAAAAAACAGAAAATACTCGCGTGTCTTACC
CAATTTATCACATTGATAACATTGTAACCAAGTTTCTCGTCAGGTCACGCAACTAAAGTGATTTTC
TTAACTGCAGATGCATTTGGCGTATTACCACAGTATCTAAATTGACACCAGAACAACTAAATACTA
CTTCTTATCTGGTTTACAGCAAAATTAGCAGGTAAGTGAACGTTGTTTACTGAACCAACTCCAATT
TCTCAGCATGTTTCGGTGCTGCGTTCTTAAACCTTCAACCACTCAATATGCAGAAGTGTAGTAAAA
CGTATGCAAGCAGTGGGTGCTGAAGCTTACTTAGTAAATACTGGTTGGAATGGCACAGGCAAACTG
ATCTCAATCAAAGATACTCGCGGAATCATTGATGCAATCTTAGATGGCTCAATTGAAAAAGCTGAAA
TGGGCGAATTACCAATCTTAACTTAGCCATTCTTAAAGCATTACCAGGTGTAGATTCTGCAATCTTA
GATCCTCGCGATACTTACGAGATAAAGCACAATGGCAATCAAAGCTGAAGACTTAGCAGGTGCTT
TTGTGAAAAACTTTGTTAAATATGCAACTAACGAAGAAGGCAAGCTTTAATTGCAGCTGGTCTTAA
AGCTTAACTAGAAAAGCTTCTAGAGGCATCAAAATAAACGAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCC
 TTTCTTTTATCTGTTGTTGTCGGTGAACGCTCTCTGAGT

FIGURA 48

AGGACGAATTCACCTTCTGTTCTAACACCCCTCGTTTTCAATATATTTCTGTCTGCATTTTATTCAAATTCT
 GAATATACCTTCAGATATCCTTAAGGAATTGTCGTTACATTCGGCGATATTTTTCAAGACAGGTTCT
 TACTATGCATTCCACAGAAGTCCAGGCTAAACCTCTTTTTAGCTGGAAAGCCCTGGGTTGGGCACTG
 CTCTACTTTTGGTTTTCTCTACTCTGCTACAGGCCATTATTTACATCAGTGGTTATAGTGGCACTAAC
 GGCATTGCGGACTCGCTGTTATTTCAGTTCGCTGTGGTTGATCCCGGTATTCTCTTTCCGAAGCGGAT
 TAAAATTATTGCCGCAGTAATCGGCGTGGTGCTATGGGCGGCCTCTCTGGCGGCCTGTGCTACTAC
 GTCATCTACGGTCAGGAGTTCTCGCAGAGCGTTCTGTTTGTGATGTTGAAACCAACACCAACGAAG
 CCAGCGAGTATTAAAGCCAGTATTTTCAGCCTGAAAATTGTGCTTATCGCGCTGGCCTATACGGCGGT
 GGCAGTTCTGCTGTGGACACGCCTGCGCCCGGTCTATATCCAAAGCCGTGGCGTTATGTTGTCTCTT
 TTGCCCTGCTTTATGGCTTGATTCTGCATCCGATCGCCATGAATACGTTTATCAAAAACAAGCCGTTT
 GAGAAAACGTTGGATAACCTGGCCTCGCGTATGGAGCCTGCCGCACCGTGGCAATTCCTGACCGGC
 TATTATCAGTATCGTCAGCAACTAACTCGCTAACAAAGTTACTGAATGAAAATAATGCCTTGCCGCC
 ACTGGCTAATTTCAAAGATGAATCGGGTAACGAACCGCGCACTTTAGTGCTGGTGATTGGCGAGTC
 GACCCAGCGCGGACGCATGAGTCTGTACGGTTATCCGCGTGAAACCACGCCGGAGCTGGATGCGCT
 GCATAAAACCGATCCGAATCTGACCGTGTTAATAACGTAGTTACGTCTCGTCCGTACACCATTGAAA
 TCCTGCAACAGGCGCTGACCTTGCCAATGAAAAGAACCCGGATCTGTATCTGACGCAGCCGTGCT
 GATGAACATGATGAAACAGGCGGGTTATAAAACCTTC

FIGURA 48 (cont.)

**FIG. 49****FIG. 50**

**FIG. 51**

AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCTCTTACCTCGAGAATTGTGAGCGGATAACAATTGACATTG
 TGAGCGGATAACAAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTGACCGAATTCAATTAAGCTAGCAA
 GAGGAGAAGTCGAGATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAACCTTTTGCCCGCTATGGCTTACC
 AGCACCGGTGGGTATGCCTGTACTACTCCGCGCAAGCAGAAAGCCGCTTCAAAAATCGGTGC
 CGGTCCGTGGGTAGTAAAATGTCAGGTTACGCTGGTGGCCGCGGTAAAGCGGGCGGTGTGAAAG
 TTGTAAACAGCAAAGAAGACATCCGTGCTTTTGCAAAAACTGGCTGGGCAAGCGTCTGGTAACGT
 ATCAAACAGATGCCAATGGCCAACCGGTTAACCAGATTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAA
 AGAGCTGTATCTCGGTGCCGTGTTGACCGTAGTTCCTCGTGTGGTCTTTATGGCTCCACCGAA
 GGCGGCGTGAAAATCGAAAAAGTGGCGGAAGAACTCCGCACCTGATCCATAAAGTTGCGCTTGAT
 CCGCTGACTGGCCCGATGCCGTATCAGGGACGCGAGCTGGCGTTCAAACCTGGGTCTGGAAGGTAAA
 CTGGTTCAGCAGTTCACCAAAATCTCATGGGCCTGGCGACCATTTCTGGAGCGCGACCTGGCGT
 TGATCGAAATCAACCCGCTGGTCATCACCAAACAGGGCGATCTGATTTGCCTCGACGGCAAACCTGGG
 CGCTGACGGCAACGCACTGTTCCGCCAGCCTGATCTGCGCGAAATGCGTGACCAAGTCGCAGGAAGA
 TCCGCGTGAAGCACAGGCTGCACAGTGGGAACTGAACTACGTTGCGTGGACGGTAACATCGGTTG
 TATGGTTAACGGCGCAGGTCTGGCGATGGGTACGATGGACATCGTAAACTGCACGGCGGCGAACC
 GGCTAACTTCCTTGACGTTGGCGGCGGCGCAACCAAAGAACGTGTAACCGAAGCGTTCAAAATCAT
 CCTCTCTGACGACAAAGTGAAAGCCGTTCTGGTTAACATCTTCGGCGGTATCGTTCTGTTGCGACCTG
 ATCGCTGACGGTATCATCGGCGCGGTAGCAGAAGTGGGTGTTAACGTACCGGTCTGGTACGCTCTG
 GAAGGTAAACAACGCCGAACCTGGCGCGAAGAACTGGCTGACAGCGGCCTGAATATTATTGCAGCA
 AAAGGTCTGACGGATGCAGCTCAGCAGGTTGTTGCCGAGTGGAGGGGAAATAATGTCCATTTTAA
 TCGATAAAAACACCAAGGTTATCTGCCAGGGCTTTACCGGTAGCCAGGGGACTTTCCACTCAGAACA
 GGCCATTGCATACGGCACTAAAATGGTTGGCGGCGTAACCCAGGTAAAGGCGGCACCAACCCACCT
 CGGCCTGCCGTTGTTCAACACCGTGCGTGAAGCCGTTGCTGCCACTGGCGCTACCGCTTCTGTTATC
 TACGTACCAGCACCGTTCTGCAAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGCAGGCATCAAACCTGATTA
 TCACCATCACTGAAGGCATCCCGACGCTGGATATGCTGACCGTGAAAGTGAAGCTGGATGAAGCAG
 GCGTTCTGATGATCGGCCGAACTGCCAGGCGTTATCACTCCGGGTGAATGCAAAATCGGTATCCA
 GCCTGGTCACATTACAAACCGGGTAAAGTGGGTATCGTTTCCCGTTCGGGTACACTGACCTATGAA
 GCGGTTAAACAGACCACGGATTACGGTTTCGGTCAGTCGACCTGTGTGCGTATCGGCGGTGACCCG
 ATCCCGGGCTCTAACTTTATCGACATTCTCGAAATGTTGAAAAAGATCCGCAGACCGAAGCGATCG
 TGATGATCGGTGAGATCGGCGGTAGCGCTGAAGAAGAGCAGCTGCGTACATCAAAGAGCACGTT
 ACCAAGCCAGTTGTGGGTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCCGAAAGGCAAACGTATGGGCCACGCG
 GGTGCCATCATTGCCGTTGGGAAAGGGACTGCGGATGAGAAATTCGCTGCTCTGGAAGCCGACGG
 CGTGAAAACCGTTGCGAGCCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAAACCTGTTCTGAAATAATCTAGC
 AAGAGGAGAAGTCGACATGGAAATCAAAGAAATGGTGAGCCTTGACGCAAGGCTCAGAAGGAGT
 ATCAAGCTACCCATAACCAAGAAGCAGTTGACAACATTTGCCGAGCTGCAGCAAAAGTTATTTATGA
 AAATGCAGCTATTCTGGCTCGCAAGCAGTAGACGAAACCGGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGT
 GGCCAAGAATCAAGGCAAATCCAAAGGTGTTTGGTACAACCTCCACAATAAAAAATCGATTGGTATC
 CTCAATATAGACGAGCGTACCGGTATGATCGAGATTGCAAAGCCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTA
 ACGCCGACGACCAACCCGATCGTTACTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGC
 CATCATTATTGCCCCCACCAGATCCAAAAATGCTCTGCACACGCAGTTCGTCTGATCAAAGAAG
 CTATCGCTCCGTTCAACGTACCGGAAGGTATGGTTCAGATCATCGAAGAACCAGCATCGAGAAGAC
 GCAGGAACTCATGGGCGCCGTAGACGTAGTGTGCTACGGGTGGTATGGGCATGGTGAAGTCTG
 CATATTCTTCAGGAAAGCCTTCTTCGGTGTGGAGCCGGTAACGTTTCAGGTGATCGTGGATAGCAA
 CATCGATTTCGAAGCTGCTGCAGAAAAAATCATCAC

FIGURA 52

CGGTCGTGCTTTTCGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGCATCATCTACAACGAGGCTGAC
 AAGGAAGCAGTTTTACAGCATTCCGCAACCACGGTGCATATTTCTGTGACGAAGCCGAAGGAGAT
 CGGGCTCGTGAGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGATGTAGTAGGTCAGAGCGTTGCC
 TTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTATTCTCGTTGTTGAAGCTCGCG
 GCGTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAAGATGTGTCCCGTAATGTGCGCCCTCAGCTACA
 AGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAACGAAGGTAACGGCCACACCT
 GTGCTATCCACTCCAACAATCAGGCACACATCATCTCGCAGGATCAGAGCTGACGGTATCTCGTAT
 CGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTACATCCAAAACGGTCTTGCCGTAACCAAT
 ACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCGGAGAACTTCACTTACAAGCACCTCCTCA
 ACATTTACGCATCGCACCGTTGAATTCAAGCATTACATCCCCGATGACAAAGAAATCTGGGAACT
 CTAATCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGCAACTTTTCAAACCTCAAGAGTGTAACACATCACTTTGA
 CACTTTTGCGAATTTGCCAAGGAATTCTGTCTTGAGAACGCGACTTGGTAATTACCAACGAGTTC
 ATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGCCAGCTCCCCTGCCATTTTGTTATGCAGGAGAAATATGGGC
 AAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGAATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCG
 CGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGTTATTGACATCTCTAAACTTTTCGTTCTGAAAGGATTAAAT
 GATGTACTCGATGCATTGACCGCAAAATACCTCTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCCA
 CAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGACGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAGCCGTCACACCA
 AAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGTTGCAGACCATGCCATCATCATACCTGAACTTCTGAAGAG
 CTTGCCTTTCCACTTCTACGCATGCAGTGCAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATC
 TCCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGTTCAAGTGAGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCA
 AGAAAATCGCCGAACACGGCCCTGAATACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCA
 ACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAAATGCAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGG
 AGGCAACTATCAGTGCCGCATGGAGAAGCAAACATCAGTTCTTACAGAGGTATTCAAAGTATAC
 CAAAAGAAGAATCCTTTTCGGCTATATAGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCC
 AGCCCGAATACGTATATCCGAAGCTGGATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCAC
 GAATACGGCATGAAGGACGAAGAGGTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAG
 ATTGCTCGCCAACAACTACGTAGAGCTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTAC
 TAATCTAGAAAGCTTCCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTC
 GTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCTAGGC
 GTTCGGCTGCGACACGTCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTA
 GAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTATATGGACCATGGCTAATCCCAT

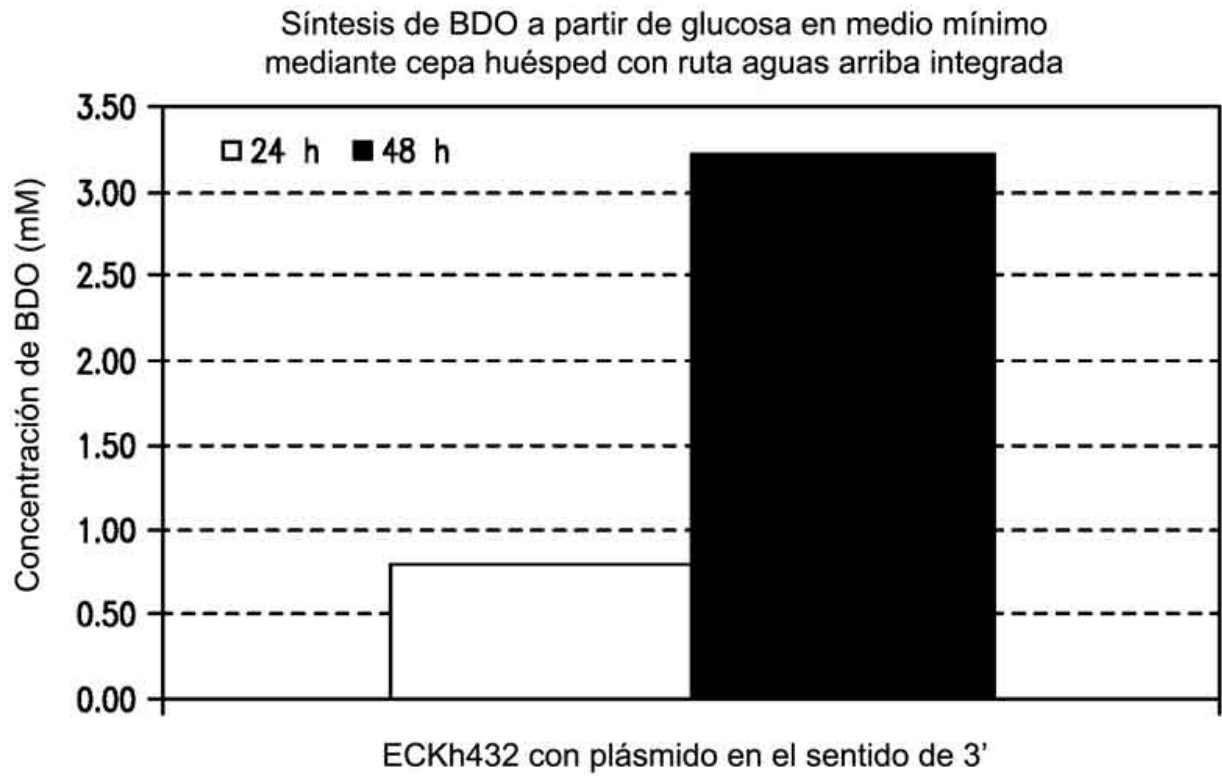
FIGURA 52 (cont.)

TCGAGAAATTTATCAAAAAGAGTGTTGACTTGTGAGCGGATAACAATGATACTTAGATTCAATTGTG
 AGCGGATAACAATTTACACAGAATTCAATTAAGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGGCCAACAT
 AAGTTCACCATTCGGGCAAAACGAATGGCTGGTTGAAGAGATGTACCGCAAGTTCCGCGACGACCC
 CTCTCGGTCGATCCCAGCTGGCAGAGTTCCTGGTTGACTACAGCCCCGAACCCACCTCCCAACCA
 GCTGCCGAACCAACCCGGGTTACCTCGCCACTCGTTGCCGAGCGGGCCGCTGCGGCCGCCCGCAG
 GCACCCCCCAAGCCGGCCGACACCGCGGCCGCGGGCAACGCGTGGTCGCCGCACTGGCCGCCAA
 AACTGCCGTTCCCCCGCCAGCCGAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGCGCGGCCGCCGCGCGGCCG
 TCGTCAAGAACATGTCCGCGTCGTTGGAGGTGCCGACGGCGACCAGCGTCCGGGCGGTCCCGGCCA
 AGCTACTGATCGACAACCGGATCGTCATCAACAACCAAGTTGAAGCGGACCCGCGGCCGGAAGATCT
 CGTTCACGCATTTGCTGGGCTACGCCCTGGTGACGGCGGTGAAGAAATCCCGAACATGAACCGGC
 ACTACACCGAAGTCGACGGCAAGCCACCGCGGTACGCCGGCGCACACCAATCTCGGCTGGCGA
 TCGACCTGCAAGGCAAGGACGGGAAGCGTTCCTGGTGGTGCCGGCATCAAGCGGTGCGAGACC
 ATGCGATTGCGCGAGTTCGTACGGCCTACGAAGACATCGTACGCCGGGCCCGCGACGGCAAGCTG
 ACCACTGAAGACTTTGCCGGCTGACGATTCGCTGACCAATCCCGGAACCATCGGCACCGTGCATT
 CGGTGCCGCGGCTGATGCCCGGCCAGGGCGCCATCATCGGCGTGGGCGCCATGGAATACCCCGCC
 GAGTTTCAAGGCGCCAGCGAGGAACGCATCGCCGAGCTGGGCATCGGCAAATTGATCACTTTGACC
 TCCACCTACGACCACCGCATCATCCAGGGCGCGGAATCGGGCGACTTCCTGCGCACCATCCACGAGT
 TGCTGCTCTCGGATGGCTTCTGGGACGAGGTCTCCGCGAACTGAGCATCCCATATCTGCCGGTGCG
 CTGGAGCACCGACAACCCGACTCGATCGTCGACAAGAAGCTCGCGTCATGAAGTTGATCGCGGC
 CTACCGCAACCGCGGCCATCTGATGGCCGATACCGACCCGCTGCGGTTGGACAAAGCTCGGTTCCCG
 AGTCACCCCGACCTCGAAGTGCTGACCCACGGCCTGACGCTGTGGGATCTCGATCGGGTGTTCAAG
 GTCGACGGCTTTGCCGGTGCGCAGTACAAGAACTGCGCGACGTGCTGGGCTTGCTGCGCGATGCC
 TACTGCCGCCACATCGGCGTGGAGTACGCCCATATCTCGACCCCGAACAAAAGGAGTGGCTCGAA
 CAACGGGTGCGAGACCAAGCACGTCAAACCCACTGTGGCCCAACAGAAATACATCCTCAGCAAGCTC
 AACGCCGCCGAGGCCTTTGAAACGTTCTACAGACCAAGTACGTGCGCCAGAAGCGGTTCTCGCTG
 GAAGGCGCCGAAAGCGTGATCCCGATGATGGACGCGGCGATCGACCAAGTGCCTGAGCACGGCCT
 CGACGAGGTGGTCATCGGGATGCCGACCGGGGCCGGCTCAACGTGCTGGCCAACATCGTCGGCA
 AGCCGTACTCGCAGATCTTCACCGAGTTCGAGGGCAACCTGAATCCGTGCGAGGCGCACGGTCCG
 GTGACGTCAAGTACCACCTGGGCGCCACCGGGCTGTACCTGCAGATGTTGCGCGACAACGACATTC
 AGGTGTGCTGACCGCCAACCGTCGCATCTGGAGGCCGTGACCCGGTGCTGGAGGGATTGGTGC
 GGGCCAAGCAGGATCTGCTCGACCACGGAAGCATCGACAGCGACGGCCAACGGGCGTTCTCGGTG
 GTGCCGCTGATGTTGCATGCGGATGCCGCTTCGCCGTCAGGGTGTGGTGCCTGAGACGCTGAAC
 CTGGCGAATCTGCCGGGCTACCGCTCGGCGGCACCATCCACATCATCGTCAACAACCAAGATCGGCT
 TCACCACCGCGCCCGAGTATTCCAGGTCCAGCGAGTACTGCACCGACGTGCGAAAGATGATCGGGG
 CACCGATCTTTCACGTCAACGGCGACGACCCGGAGGCGTGTGTCTGGGTGGCGCGGTTGGCGGTGG
 ACTTCCGACAACGGTTCAAGAAGGACGTGTCATCGACATGCTGTGCTACCGCCGCCGCGGGCACA
 ACGAGGGTGACGACCCGTGATGACCAACCCCTACATGTACGACGTGCTCGACACCAAGCGCGGGG
 CCCGCAAAAGCTACACCGAAGCCCTGATCGGACGTGGCGACATCTCGATGAAGGAGGCCGAGGAC
 GCGCTGCGCGACTACCAGGGCCAGCTGGAACGGGTGTTCAACGAAGTGCGCGAGCTGGAGAAGCA
 CGGTGTGACGCCGAGCGAGTCGGTCGAGTCCGACCAGATGATTCCCGCGGGGCTGGCCACTGCGG
 TGGACAAGTCGCTGCTGGCCCGGATCGGCGATGCGTTCTCGCCTGCCGAACGGCTTCACCGCGCA
 CCCGCGAGTCCAACCGGTGCTGGAGAAGCGCCGGGAGATGGCCTATGAAGGCAAGATCGACTGGG
 CCTTGGCGAGCTGCTGGCGCTGGGCTCGCTGGTGGCCGAAGGCAAGCTGGTGCCTGTGCGGGC
 AGGACAGCCGCCGCGGCACCTTCTCCAGCGGCATTGCGTTCTCATCGACCGCCACACTGGCGAGG
 AGTTCACACCACTGCAGCTGCTGGCGACCAACTCCGACGGCAGCCGACCGCGGAAAGTTCCTGG
 TCTACGACTCGCCACTGTCGGAGTACGCCGCCGTGCGCTTCGAGTACGGCTACACTGTGGGCAATCC
 GGACGCCGTGGTGCTCTGGGAGGCGAGTTCGGCGACTTCGTCAACGGCGCACAGTCGATCATCGA

FIGURA 53

CGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGTCGTGCTGCTGTTACCGCAC
 GGGCACGAGGGGCGAGGGACCCGACCACACTTCTGCCCCGATCGAACGCTTCTTGCAAGTTGTGGGCG
 GAAGGTTTCGATGACCATCGCGATGCCGTCGACTCCGTCGAACTACTTCCACCTGCTACGCCGGCATG
 CCCTGGACGGCATCCAACGCCCGCTGATCGTGTTACGCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAAGGCCGC
 CGTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCGGCTCAGTGCTGGAGGAACCCACCTATGA
 GGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTCAGCCGGATCCTGCTGACCAGTGGCAAGCTGTATTACGA
 GCTGGCCGCCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACAGCTCGC
 CCCGCTGCCCAGGCGTCGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAAGCTCAAGGAGTTCTTCTG
 GGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGCGTGCCGCGATTGGGCTCGAACTACCCGAGCTGCT
 GCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTCGTCAGGCTC
 GTCGAAGGTGCACGCCGTGCAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTCCGGCTAATCTAGCAAGA
 GGAGAAGTCGACATGAAGTTATTAATAATTGGCACCTGATGTTTATAAATTTGATACTGCAGAGGAGT
 TTATGAAATACTTTAAGGTTGGAAAAGGTGACTTTATACTTACTAATGAATTTTTATATAAACCTTTCC
 TTGAGAAATCAATGATGGTGCAGATGCTGTATTTGAGGAGAAATATGGACTCGGTGAACCTTCTGA
 TGAAATGATAAACAATATAATTAAGGATATTGGAGATAAACAATATAATAGAATTATTGCTGTAGGG
 GGAGGATCTGTAATAGATATAGCCAAAATCCTCAGTCTTAAGTATACTGATGATTCATTGGATTTGTT
 TGAGGGAAAAGTACCTCTTGTAACAAAACAAGAATTAATTATAGTTCCAACATACATGTGGAACAGGT
 TCAGAAGTTACAAATGTATCAGTTGCAGAATTAAGAGAAAGACATACTAAAAAAGGAATTGCTTCA
 GACGAATTATATGCAACTTATGCAGTACTTGTACCAGAATTTATAAAAGGACTTCCATATAAGTTTTT
 TGTAACCAGCTCCGTAGATGCCTTAATACATGCAACAGAAGCTTATGTATCTCAAATGCAATCCTT
 AACTGATATGTTTAGTGTAAGCTATGGAGTTAATTTTAAATGGATACATGCAATGGTAGAGAA
 AGGAAATGATTACAGAGTTGAAATAATTGAGGATTTGTTATAGGCAGCAATTATGCAGGTATAGCT
 TTTGGAAATGCAGGAGTGGGAGCGGTTACGCACTCTCATATCCAATAGGCGGAAATTATCATGTGC
 CTCATGGAGAAGCAAATTATCTGTTTTTACAGAAATATTTAAACTTATTATGAGAAAAATCCAAT
 GGCAAGATTAAAGATGTAAATAAACTATTAGCAGGCATACTAAAATGTGATGAAAGTGAAGCTTAT
 GACAGTTTATCACAACTTTTAGATAAATTATTGTCAAGAAAACCATTAAGAGAATATGGAATGAAAG
 AGGAAGAAATTGAAACTTTTGCTGATTCAGTAATAGAAGGACAGCAGAGACTGTTGGTAAACAATT
 ATGAACCTTTTTCAAGAGAAGACATAGTAAACACATATAAAAAGTTATATTAATCTAGAAAGCTTCCT
 AGAGGCATCAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTC
 GGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCTA

FIGURA 53 (cont.)

**FIG. 54**

cscR w/5' del

PRM SENTIDO

1 TCTGTATCAG GCTGAAATC TTCTCTCATC CGCCAAAACA GCTTCGGCGT TAAGATCGGC GCTCAAGGAC GTAAGCCGTC GACTCTGCCC GTGCTGGCGC
 AGACATAGTC CGACITTTTAG AAGAGAGTAG GCGGTTTTGT CGAAGCCGCA ATTCTACGCG CGAGTTCCTG CATTCGGCAG CTGAGAGGCG CACGACGCGC
 cscR w/5' del

101 AGGACACGGC TACCACTCCT TTCTCTGTTG ATATCTGCT TGCCATTGAG CAAACCGCCA GCGAGTTCGG CTGGAATAGT TTTTAAATCA ATATTTTTTC
 TCTGTGCGG ATGGTGAGGA AAGAGCAAC TATAGACGA ACGTAATTC GTTGGCGGT CGTCAAGCC GACCTTATCA AAAAATTAGT TATAAAAAAG
 cscR w/5' del

201 TGAAGATGAC GCTGCCCGCG CGGCACSTCA GCTGCTTGGC CACCGTCCGG ATGGCATTAT CTATACTACA ATGGGGCTGC GACATATCAC GCTGCCGTGAG
 ACTTCTACTG CGACGGGCGC GCGGTGCAGT CGACGAACGG GTGGCAGGCC TACCGTAATA GATATGATGT TACCCCGACG CTGTATAGTG CGACGGACTC
 cscR w/5' del

301 TCTCTGTATG GTGAAATAT TGTATTGGCG AACTGTGTGG CGSATGACCC AGCGTTACCC AGTTATATCC CTGATGATTA CACTGCACAA TATGAATCAA
 AGAGACATAC CACTTTTATA ACATAACCGC TTGACACACC GCTTACTGGG TCGCAATGGG TCAATATAGG GACTACTAAT GTGACGTGTT ATACTTAGTT
 cscR w/5' del

401 CACAGCATTT GCTCGCGCGG GGCTATCGTC AACCGTTATG CTTCGTGCTA CGGAAAGTG CGTTGGCAAC AGGSTATCGT CGGCAGGGM TTGAGCAGGC
 GTGTCTGAAA CGAGCGCGCG CGATAGCAG TTGGCAATAC GAAGACCGAT GGCCTTTTAC GCAACCGTTG TCCCATAGCA GCGGTCCCTA AACTCGTCCG
 cscR w/5' del

501 CTGGCGTGAT GCTGGACGAG ATCTGGCTGA GGTGAACAA TTTCACATGG CAACAGTGTA TGATCACTAC ACGATCTCG CAAGTTTACT CAATGCCAC
 GACCGCACTA CGACCTGCTC TAGACCGACT CCACTTTGTT AAGTGTATCC GTTGCCACT ACTAGTGATG TGGCTAGAGC GTTCAAATGA GTTACGGGTG
 cscR w/5' del

601 TTCAAACCGG GCAAAACAGA TTTTGAATGT CTGATATGTG GTACGATCG CGCAGCCTTT GTGGCTTATC AGGTTCTTCT GCGGAAGGGG GTACGAATCC
 AAGTTTGGCC GGTTTGGTCT AAAACTACAA GACTATACAC CATGTCTAGC GCGTCGAAA CACGGAATAG TCCAAGAGA CCGCTTCCCC CATGCTTAGG
 cscR w/5' del

701 CGCAGGATGT CGCGTAATG GGCITTTGATA ATCTGGTTGG CGTCGGGCTT CTGTTTTTAC CGCGCTGAC CACAATTCAG CTTCACATG ACATTATGG
 GCGTCTTACA GCGGCATTAC CGAAACTAT TAGACCAACC GCAGCCCGTA GACAAAATG CGGGGACTG GTGTTAAGTC GAAGGTGTAC TGTANTAGCC
 cscR w/5' del

801 GCGGAGAGCT GCATTGCATA TTATTGAAGG TGTGAAGGG GGAAGATGA CGCGATCCC TTGCCCCGTC TTGATCCGTT GTTCCACTG ATATTATGTT
 CGCCCTTCCA CGTAACGTAT AATAACTTCC AGCACTTCCC CTTTCTCACT GCGCTAGGG AACGGCGAC AACTAGGCAA CAGGTGAC TATAATACAA
 cscA

901 AACCCAGTAG CCAGAGTGCT CCATGTTGCA GCACAGCCAC TCCGTGGAG GCATAAAGCG ACAGTTCCCG TTCTTCTGTC TCGGGATAGA TTGACTACT
 TTGGGTATC GGTCTCAGG GGTACAACGT CGTGTGCGTC AGGCACCTC CGTATTTGTC TGTCAAGGC AAGAAGCCG ACGCCTATCT AAGCTGATGA

cscA

1001 CATCACCGCT TCCCGTCTGT TAATAATAC TTCCACGGAT GATGTATGTA TAAATATCT TAGGGCGAGC GTGTACGCT GCGGGAGGGG AATACTACGG
 GTAGTGSCGA AGGGGCAGCA ATTATTATG AAGGTGCTA CTACATAGCT ATTTATAGGA ATCCCGCTCG CACAGTGCA GCGCTCCCC TTATGATGCC

FIG. 55

cscA

1101 TAGCGTCTA AATTCTCGT TGGTAATAC CGCCACAAA CAAGTCGCTC AGATTGGTTA TCAATATACA GCCGCAITCC AGTCCCGAGC TGTAAATCGT
ATCGGCAGAT TTAAGAGCAC ACCCATTATG GCGGTGTTT GTTCAGCGAG TCTAACCAAT AGTTATATGT CCGCGTAAGG TCACGGCTCG ACATTAGGCA

cscA

1201 AATGTTGGC ATCACTGTTT TTCAGCGCC ACTGCAACTG AATCTCAACT GCTTGGCGT TTTCTGCAA AACATAITTA TTGCTGATTG TCGGGGAGA
TTACAAGCCG TAGTGACAAG AAGTCGCGG TGACGTTGAC TTAGAGTTGA CGAAGCGCA AAAGGACGTT TTGTATAAAT AACGACTAAC ACGCCCTCT

cscA

1301 GACAGATTGA TGCTGCTGC GTAACGACTC AGCTTCGTGT ACCGGGCGTT GTAGAAGTTT GCCATTGCTC TCTGATAGCT CCGCGGOCAG CGTCATGCAG
CTGTCTAACT ACGAGGACCG CATGCTGTAG TCGAAGCACA TGGCCCGCAA CATCTTCAA CCGTAACGAG AGACTATCGA GCGCGCGGTC GCAGTAOSTC

cscA

1401 CCTGCCATC CTTACGTTT TGAGGGCAIT GCGGATGCC ACATATCCAT CCAGCGGATA ACAATACGCC GACCATCTT CGCTAAAAG CTTTGTGGTG
GGACGGTAG GAGTGCAAA ACTCCGTAA CCGCTAAGG TGTATAGGTA GTCGGCTAT TGTATGCGG CTGGTAGGAA GCGATTTTTC GAACACCCAC

cscA

1501 CATAAAGTC ATGCGCGTIA TCAAGTTCAG TAAATGCC GGAATGTGA AAAAGTCGT CTGGCGACCA CATTCCGGT ATTACGCCAC TTTGAAGCG
GTATTTTCAG TACGGGCAAT AGTTCAGTC ATTITACGG CTTAACAGT TTTTCAGCAG GACCGCTGGT GTAAGGCCA TAATCGGGT AAACITTCGC

cscA

1601 ATTTGGTAA CTGTATCCT CGGCATTAT TCCTCGCGG GAAACATCA GATAATGCTG ATCGCCAAG CTGAAAAAG CCGGACATTC CCACATATAG
TAAGCCATT GACATAGGA GCGTAAGTA AGGGACGCCC CTTTGTAGT CTATTACGAC TAGCGTTCC GACTTTTCA GCGCTGAAG GGTGTATATC

cscA

1701 CTTTCACCG CATCAGCGT GGCAGTAGC CGATCGAAG TCATTTCAG CAACGAACTG CCGCGATAA GCAGGATCTG CCCCGTGTG CTTGATCTT
GAAGTGGG GTAGTCGAC CCGTCATGC GTAGCTTCC AGGTAAGTC GTTGCTTGAC GCGCTATTT CGTCTAGAG GGGGCACAC GAACCTAGAA

cscA

1801 TCGCCCCGAC TACCATCCAC CATGTGTGG CTTACGCCA CACTTTAGGA TCGCGGAAG GCATGATTCC TTCTGGTGA GTGAGGATCA CACCTGTTT
AGCGGGCTG ATGTAGGTG GTACACGCC GAAGTGGGT GTGAAATCT AGCGCTTCA CGTACTHAGG AAGACCACCT CACTCTAGT GTGGGACAAA

cscA

1901 CTCGAAATGA ATACCATCC GACTGGTAGC CAGACATTGT ACTTCGCGAA TTGCATGTC ATTACCTGCA CCATCGAGCC AGACGTGTCC GGTGTAGATA
GAGCTTACT TATGGTAGG CTGACCATCG GTCTGTACA TGAAGGCTT AACGTAGCAG TAATGGAGT GTAGCTCGG TCTGCACAG CCACATCTAT

cscA

2001 AGTGAGAGGA CACCATGTC ATCGACAACA CTACCTGAAA AACACCGTC TTTGTCTTA TGTCTCTG GCGCTAGGC AATAGGCTCA TGTGCCAGT
TCACTCTCT GTGGTAACAG TAGCTGTGT GATGGACTTT TTGTGGCAG AACAGTAAT AGCAGAGGAC CCGGATCGG TTATCCGAGT ACGACGCTCA

cscA

2101 GGATCATATC GTCGCTGGTG GCATGTCCC AGTGCAITGG CCCCCAGTGT TCGCTCATCG GATGATGTTG ATAAAACGCG TGATAAGAT CGTTAAACCA
CCTAGTATAG CAGCGACCAC CGTACAGGG TCAAGTAACC GGGGTCACA AGCGAGTAGC CTACTACAAC TATTTTGGC ACTATTGCTA GCAATTTGTT

cscA

FIG. 55 (cont.)

```

2201  GATCAGCCCG TTGGATCGT TCATCCACC GGCAGGAGC GCGAGGTGAA AATGGGGATA GAAAGTGTTA CCCCCTGCT CATGAAGTTT TGCTAGGGCG
    CTAGTCCGGC AAACCTAGCA AGTAGGTGGG CCGTCTCCG CGTCCACTT TTACCCCTAT CTTTCACAA GTGGCCACGA GTACTTCAAA ACGATCCCGC
-----
                                cscA
2301  TTTTCCGCG CATGCAATCG AGATTGCGT ATTTTAATCA TCGTGGTTAA GCAAATTTGG TGAATGTGA AGGTAACTT TTATAAAAT AAAGTCCTT
    AAAACGCGG GTACGTTAGC TCTAACGCG TAAATTAGT AGGACCAAT CGTTTAAACC ACTTAACAAT TGCATTTGAA AATATTTTTA TTTAGGGAA
-----
                                cscA
2401  ACTTTCATA ATGCGATGAA TATCACAAT GTTAAAGTTA ACTATGAGT TTGTGATCG AATATGCATG TTTTAGTAAA TCCATGACGA TTTTGCGAAA
    TGAAGTAAT TACGCTACT ATAGTGTGTA CAATTGCAAT TGATACTGCA AAACACTAGC TTATACGTAC AAATCAATT AGGTACTGCT AAAACGCTT
-----
                                cscK
2501  AAGAGTITTA TCATATGCG TAATCAGAT GATTTAAGG GAAAAAATG TCAGCCAAAG TATGGTTTT AGGGATGCG GTGTAGATC TCTTCCAGA
    TCTCCAAAT AGTGATACG ATTGAGTCTA CTTAANTCC CTTTTTTAC AGTCGGTTT ATACCCAAA TCCCTACGC CAGCATCTAG AGAAGGTCT
-----
                                cscK
2601  ATCAGACGG CGCTACTGC CTTGTCTGG CCGCGGCCA GCTAACGTT GGTGGGAAT GCGCAGTTA GCGGAACAA GTGGTTTAT AGGTCCGGT
    TAGTCTGCC CGGATGACG GACAGGACC GCGCGCGGT CGATTGCAAC GGCACCTTA GCGTCTAAT CCGCTTGT CACCCAAATA TCCAGCCAC
-----
                                cscK
2701  GGGGATGAT CTTTGTGTC GTTAATGCAA AGAACGTCG TAAGTGGG AGTCGATATC AGTATCTGA AGCAAGATG ATGGCACCG ACATCCACG
    CCGTACTAG GAAAAACAG CAATTACGT TCTTGGAGC ATTGACTCC TCAGCTATAG TGCATAGACT TCGTCTACT TACCGTGGC TGTAGGTGC
-----
                                cscK
2801  TGCTTGCGA TCTGAACGAT CAGGGGAAC GTTCATTAC GTTTATGTC GCGCCAGTG CGATCTTTT TTTAGAGAGC ACAGACTTC CCGCTGGCG
    ACGAACAGT AGACTTGCTA GTTCCCTTG CAGTAAATG CAATACCAG GCGGGTCAC GGCTAGAAA AATCTCTGC TGTCTGAAC GGAAGACCG
-----
                                cscK
2901  ACATGGCGA TGGTACATC TCTGTCAAT TCGTGTGCT GCGAGCCTT CGGTACCGG CGATTTACT GCGATGACG CATCCGCA TCGCGAGGT
    TGTACCGCT ACCATGTAG AGACAGTTA ACCAACAGA CGCTCGGA GCGCATGTC GGTAAATGA CGTACTGCC GCTAGGCGT ACGGCTCCA
-----
                                cscK
3001  TTTGTAGCT TCGATCCIA TATTGTGAA GATCTATGC AAGACAGCA TTTGCTCGC TTGTGTTGC GCGAGGCGT ACGATGGG GATGTGTC
    AAACAGTCA AGCTAGGAT ATAAGCACT CTAGATACG TTCTGCTGT AAACGAGCG AACACAAAG CCGTCGCGA TGTGACCG CTACAGCAGT
-----
                                cscK
3101  AGCTCTCGA AGAAGATGG CGACTTATC GTGAAAAAC ACAGAACGAT CAGGATATAT GCGCCCTGG AAAAGATAT GAGATGCGA TGTGTTGGT
    TCGAGAGCT TCTTCTTACC GCTGATAGT CACCTTTTG TGTCTTCTA GTCTATATA CGCGGAGCG TTTTCTCTA CTCTAGCGT ACGACACCA
-----
                                cscK
3201  GACTAAAGT GCAGAGGGG TCGTGGTCTG TTATCGAGG CAGTTCACC ATTTGCTGG AATGCTGTG AATTGTGTC ATAGCACGG GCGGGAGAT
    CTGATTTCCA CGTCTTCCC ACCACCGAC AATAGCTCT GTTCAAGTG TAAACGACC TTACAGACAC TTAACACAGC TATCGTCCC CCGCTCTCA
-----
                                cscK
3301  GCGTCTGTT CCGGTTACT CACAGTCTG TCTCTACGG GATTATCTAC AGATGAGAG GAAATGGAC GAATTATCA TCTCGCTCA CGTTGCGAG
    CGCAAGCAAC GCGCCATGA GTGTCAGAC AGGAGATGCC CTAAATAGT TCTACTCTT CTTTACGCT CTAATAGCT AGAGCGAGT GCAACGCTC
-----
                                cscK

```

FIG. 55 (cont.)


```

3401  CGCTTGCGGT AACGGCGAAA GGGCAATGA CAGCGCTGCC ATGTGCACAA GAACGGAAT AGTGAGAAGT AAACGGCGAA GTGCTCTTA TCTTAATA
    OCGAACGTCA TTGCGCGTTT CCGCGTACT GTGCGACGG TACAGCTGTT CTGACCTTA TCACTCTTCA TTGCGCGCTT CAGCGAGAAT AGGATTTAT
                                     cscB
3501  GGAAGTGAA TTTTAAAGA CAGGCAAGTA ATATGSCAC TGAATATTC ATTCAGAAAT GGTACTATC GTTTGCAATC CAGTTACTCA TTTCTCTTT
    CTTGCACTTA AAAAATTGCT GTCCGTCCAT TAATAACGTG ACTTATAAGG TAAGTCITTA CCGATGATAG CAAACGATG GTCAATGAGT AAGAGAAAA
                                     cscB
3601  TTATTTCTG GTGCTGTGG TGGTGTAT ACCTATTG GCTGAAAGA CATCTAGGT TGACGGGAC GGAATTAGT ACATTTAT CCGTCAACCA
    AATAAGGAC CAGCGACCT ACCAGCAATA TGCGATAAC GAGCTTTCT GTAGATCCA ACTGTCCCTG CTTAATCCA TGTGAATAA GCGAGTTGGT
                                     cscB
3701  GTTACCAGC ATCTATTTA TGAATCTTA CGGCATGTT CAGGATAAAC TGGTCTGAA GAAACGCTC ATCTGGTGA TGAATTTAT CTTGGTCTG
    CAATGCTG TAAGATAAT ACTACAAGT GCGTAGCAA GTCTATTG AGCCAGACT CTTTGGCGAG TAGACCAT ACTCAAGTA GGAACCAAC
                                     cscB
3801  ACCGGACCGT TTATGATTA CGTTATGAA CCGTACTGC AAGCAATTT TTCTGTAGT CTAATCTGG GGGCGCTATT TTTTGGCTG GGTATCTGG
    TGGCTGGCA AATACTAAT GCAATACTT GGCATGAG TTCTGTTAAA AAGACATCA GATTAAGAC CCGCGATAA AAACCGAAC CCGATGACC
                                     cscB
3901  CGGATGCGG TTGCTTGAT AGCTTACCG AAAAATGGC GCGAATTTT CATTTGCAAT ATGGAACAGC GCGCGCTGG GATCTTTTG GCTATGCTAT
    GCGCTAGCC AAACGAATA TCGAAGTGC TTTTTCAGC CGCTTAAAA GTAAGCTTA TACCTTGTC GCGCGGACC CTAAGAAAC CGATACATA
                                     cscB
4001  TGGCGCTTC TTGCGCGCA TATTTTATG TATCAGTCC CATATCACT TCTGTTGGT CTGCTATT TTGCTGTAT TTATGATGAT CAACATGCT
    ACCGCGAAG AACGGCGCT ATAAAAATC ATAGTCAGG GTATGTTGA AGACCAACA GAGCGATAA CCGCGACATA AATCTACTA GTTGTGCGA
                                     cscB
4101  TTAAAGATA AGGATACCA GTGCTAGCG GCAGATCGG GAGCGTAAA AAAAGAGAT TTATCGCAG TTTCAAGGA TCGAATCTC TGGTTTTTG
    AAATTTCTT TCTAGTGGT CAGCATGCG GTCTAGCG CTCCCAATT TTTTCTCTA AATAGCTC AAAAGTTCT AGCTTGAAG ACCCAAAAG
                                     cscB
4201  TCAATTTAT TGTGGGAGC TGTCTTCT ATACATTTT TGAACACAA CTTTTCTG TCTTTATC AGGTTATC GAATCACAG ATGTAGAAC
    AGTATAATA ACACCGCTG ACCAGAAGA TATTGAAAA ACTAGTGT TAAAAAGAC AGAAATAAG TCCAAATAAG CTTAGTGTG TACATCTTG
                                     cscB
4301  GCGCTGTAT GTTATCTCA ACTATTCCA GGTGGTACT GAAGCGCTGT GCATGGCGAT TATTCCTTC TTTGTGANT GGTAGGGCC AAAAATGCA
    CCGGACATA CCAATAGAT TGAGTAAGT CCACCATGAG CTTGCGACA GTACCGCTA ATAAGGAAG AAACACTTAG CCATCCCG TTTTTAAGT
                                     cscB
4401  TTACTTATG GAGTTGTGAT TATGCGTTG CGTATCTTT CTTGCGGCT GTTCGTTAA CCTGGAAT TTTCTTAGT GAGTTGTTA CATGCCATG
    AATGAATAG CTCACACTA ATACCGCAAC GCATAGGAAA GACCGCGCA CAGCAATTG GCGACCTAT AAGTAATCA CTTCAACAT GTACGTAAC
                                     cscB
4501  AGGTTCCAGT TTGTGCTTA TCGTCTTCA AATACAGCT GGCAACTTT GATAGCGCC TGTGTCGAC GATCTTCTG ATGTTTTC AAATGCCAG
    TCCAGGTGA AACACAGTAT AGGAGAGT TTATGTGCA CGTTTGAAA CTATTCGGG ACAGCGCTG CTAGAAAGAC TAACCAAGG TTTACCGTC
                                     cscB

```

FIG. 55 (cont.)

```

4601   TTCGCTTGGG APTGTGCTGC TTTCAACGCC GACTGGGATA CTCTTTGACC ACGCAGSCTA CCAGACAGTT TTCTTGGCAA TTTCGGGTAT TGTCTGCCTG
      AAGCGAACC TAACACGACG AAGTTTGGG CTGACCCCTAT GAGAACTGG TGGTCCGAT GGTCTGTCAA AAGAAGCSTT AAAGCCATA ACAGACGGAC
      cscB
      ~~~~~
4701   ATGTTGCTAT TTGGCATTIT CTCTTGAGT AAAAAACGCG AGCAATAGT TATGGAAACG CCTGTACCTT CAGCAATATA GACGTAAACT TTTCCGGTT
      TACAACGATA AACCGTAAAA GAAGAACTCA TTTTTTGGCG TCGTTTATCA ATACCTTTGC GGACATGGAA GTCGTTATAT CTGCATTTGA AAAAGGCCAA
4801   GTTGTGATA GCTCTATATC CCTCAACCGG AAAATAATAA TAGTAAATG CTTAGCCCTG CTAATAATCG CCTAATCCAA ACGCCTCATT CATGTTCTGG
      CAACAGCTAT CGAGATATAG GGAGTTGGCC TTTTATTATT ATCATTTTAC GAATCGGAC GATTATTAGC GGATTAGGTT TCGGGAGTAA GTACAAGACC
4901   TACAGTCGCT CAAATGTACT TCAGATGCGC GGTTCGCTGA TTCCAGGAC ATTGTCTCA TTCAGTGACC TGTCCCGTGT ATCAGGTCC TGUGAATTCA
      ATGTCAGCGA GTTTACATGA AGTCTACGG CCAAGCGACT AAAGGTCTG TAACAGCAGT AAGTCACTGG ACAGGGCACA TAGTGCCAGG ACGCTTAAGT
5001   TCAAGGAATG CATTGCGGAG TGAAGTATCG AGTCACGCCA TATTTGCTCA CCCGAAGATG AGTTTGTAGA TATTAAGGCA GTGACTTTC ACTCACA
      AGTTCCTTAC GTAACGCCTC ACTTCATAGC TCAGTGCGGT ATAAGCAGT GGGCTTCTAC TCAAACTCT ATAATTCCT CCACTGAAAG TGAAGTGT
      ~~~~~

```

PRM ANTISENTIDO

FIG. 55 (cont.)

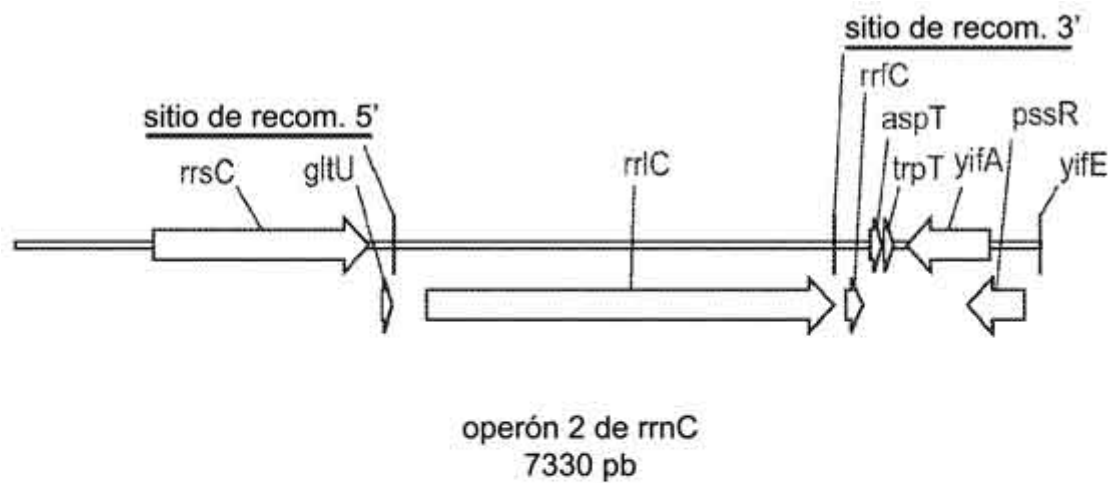


FIG. 56

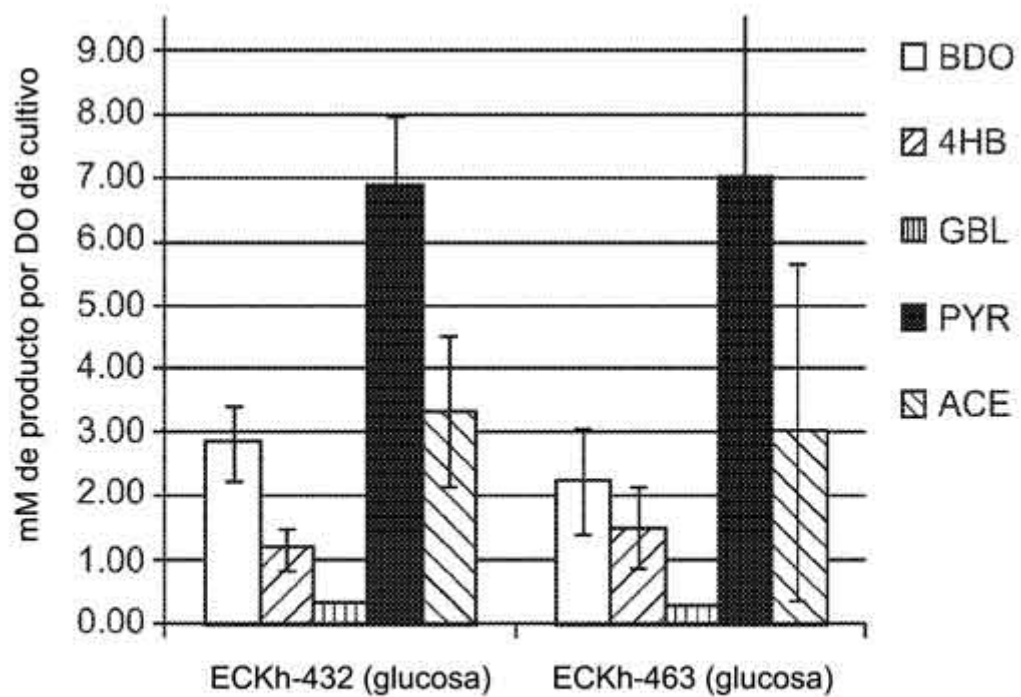


FIG. 57