

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 775**

51 Int. Cl.:

C12P 7/02 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2009 PCT/US2009/036242**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2009 WO09111672**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2009 E 09717987 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2262901**

54 Título: **Organismos productores de alcoholes primarios**

30 Prioridad:

05.03.2008 US 3414608 P
19.08.2008 US 9017108 P
31.10.2008 US 11050008 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SUN, JUN;
PHARKYA, PRITI y
BURGARD, ANTHONY P.

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 703 775 T3

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

DESCRIPCIÓN

Organismos productores de alcoholes primarios

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere en general a procesos de biosíntesis y, más específicamente, a organismos que tienen capacidad de biosíntesis de alcoholes primarios.

Los alcoholes primarios son una clase de producto de compuestos que tienen una variedad de aplicaciones industriales que incluyen una variedad de biocombustibles y productos químicos especiales. Los alcoholes primarios pueden usarse también para producir un gran número de productos industriales adicionales incluyendo polímeros y tensioactivos. Por ejemplo, se usan alcoholes primarios superiores (C_4 - C_{20}) y sus etoxilatos como tensioactivos en muchos detergentes de consumo, productos de limpieza y productos para el cuidado personal en todo el mundo tales como polvos y líquidos para el lavado de ropa, líquido lavavajillas y limpiadores de superficies duras. Se usan también en la fabricación de una variedad de productos químicos industriales y en aditivos de aceites lubricantes. Los alcoholes primarios de cadena larga, tales como octanol y hexanol, tienen propiedades organolépticas útiles y se han empleado desde hace mucho tiempo como materiales de fragancia y aroma. Se usan alcoholes primarios superiores de cadena más pequeña (C_4 - C_8) (por ejemplo, butanol) como productos químicos intermedios para la producción de derivados tales como acrilatos usados en pinturas, recubrimientos y aplicaciones de adhesivos.

Los alcoholes primarios se producen actualmente a partir de, por ejemplo, hidrogenación de ácidos grasos, hidroformilación de olefinas terminales, oxidación parcial de n-parafinas y la polimerización catalizada por Al de etileno. Desafortunadamente, no es viable comercialmente producir alcoholes primarios directamente a partir de la oxidación de hidrocarburos lineales a base de petróleo (n-parafinas). Esta inviabilidad es porque la oxidación de n-parafinas produce principalmente alcoholes secundarios, alcoholes terciarios o cetonas, o una mezcla de estos compuestos, pero no produce altos rendimientos de alcoholes primarios. Adicionalmente, los métodos conocidos actualmente para producir alcoholes primarios padecen la desventaja de que están restringidos a una materia prima que es relativamente cara, en particular etileno, que se produce por medio del craqueo térmico del petróleo. Además, los métodos actuales requieren varias etapas, y varios tipos de catalizadores.

La producción de LCA por microorganismos implica la síntesis de ácidos grasos seguido por etapas de reducción de acilo. La ruta de biosíntesis de ácidos grasos universal que se encuentra en la mayoría de las células se ha investigado para la producción de LCA y otros derivados de ácidos grasos. Existe actualmente una gran cantidad de mejora que puede lograrse para proporcionar rutas de biosíntesis más eficaces para la producción de LCA con rendimientos de energía y producto teóricos significativamente superiores.

Por tanto, existe la necesidad de medios alternativos para producir eficazmente cantidades comerciales de alcoholes primarios. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona también ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones. En algunos aspectos, se divulga en el presente documento un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene un organismo microbiano que tiene una ruta de síntesis de ácidos grasos (FAS) independiente de malonil-CoA y una ruta de reducción de acilos que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA expresada en cantidades suficientes para producir un alcohol primario, teniendo la ruta de FAS independiente de malonil-CoA cetoacil-CoA aciltransferasa o cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa, teniendo la ruta de reducción de acilos una acil-CoA reductasa y una alcohol deshidrogenasa.

En otros aspectos, se divulga en el presente documento un método para producir un alcohol primario. El método incluye cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de síntesis de ácidos grasos (FAS) independiente de malonil-CoA y una ruta de reducción de acilos que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA expresada en cantidades suficientes para producir un alcohol primario en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir el alcohol primario, teniendo la ruta de FAS independiente de malonil-CoA cetoacil-CoA aciltransferasa o cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa, teniendo la ruta de reducción de acilos una acil-CoA reductasa y una alcohol deshidrogenasa.

En algunos aspectos, se divulga en el presente documento un organismo microbiano que no se produce de manera natural que incluye una o más alteraciones génicas que se producen en genes que codifican enzimas que acoplan la producción de alcohol de cadena larga (LCA) al crecimiento del organismo microbiano que no se produce de manera natural. La producción de LCA puede lograrse durante fases sin crecimiento usando las mismas estrategias de alteración. Las una o más alteraciones génicas reducen la actividad de la enzima, mediante lo cual las alteraciones génicas confieren producción de LCA al organismo microbiano que no se produce de manera natural.

En otros aspectos, se divulga en el presente documento un método para producir LCA que incluye cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una o más alteraciones génicas. Las una o más alteraciones génicas se producen en genes que codifican una enzima que confiere producción de LCA en el organismo.

En algunos aspectos, se divulga en el presente documento un organismo eucariota que no se produce de manera natural, que incluye una o más alteraciones génicas. Las una o más alteraciones génicas se producen en genes que codifican enzimas tales como una piruvato descarboxilasa citosólica, una piruvato deshidrogenasa mitocondrial, una alcohol deshidrogenasa específica de etanol citosólica y una alcohol deshidrogenasa específica de etanol mitocondrial. Estas alteraciones confieren producción de alcoholes de cadena larga en el citosol del organismo.

En algunos aspectos, se divulga en el presente documento un organismo eucariota que no se produce de manera natural que incluye una o más alteraciones génicas. Las una o más alteraciones génicas se producen en genes que codifican enzimas tales como una piruvato descarboxilasa citosólica, una alcohol deshidrogenasa específica de etanol citosólica y una alcohol deshidrogenasa específica de etanol mitocondrial. Estas alteraciones confieren producción de alcoholes de cadena larga en la mitocondria de dicho organismo.

En otros aspectos, se divulga en el presente documento un método para producir alcoholes de cadena larga, que incluye cultivar estos organismos eucariotas que no se producen de manera natural.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la ruta de síntesis y producción de ácidos grasos independiente de malonil-CoA (MI-LCA) para producir los LCA.

La figura 2 muestra las envueltas de producción hipotéticas contrastadas de una cepa diseñada mediante OptKnock frente a una cepa de producción no acoplada al crecimiento. Las trayectorias evolutivas potenciales de la cepa de OptKnock condujeron a un fenotipo de alta producción.

La figura 3 muestra las características de producción de LCA acoplada al crecimiento del diseño de cepa I (puntos y rayas alternos) en comparación con las de *E. coli* de tipo natural (negro). Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DW/h.

La figura 4 muestra las características de producción de LCA acoplada al crecimiento de los diseños de cepa II (puntos y rayas alternos), III-V (rayas) y VI-XI (puntos) en comparación con las de *E. coli* de tipo natural (negro). Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DW/h.

La figura 5 muestra las características de producción de LCA acoplada al crecimiento de los diseños de cepa XII (puntos y rayas alternos) y XIII-XV (rayas) en comparación con las de *E. coli* de tipo natural (negro). Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DW/h.

La figura 6 muestra las características de producción de LCA acoplada al crecimiento de los diseños de cepa XVI-XVIII (puntos y rayas alternos) y XIX-XXI (rayas) en comparación con las de *E. coli* de tipo natural (negro). Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DW/h.

La figura 7 muestra las características de producción de LCA acoplada al crecimiento de los diseños I (puntos y rayas alternos), V (rayas) y V_A (puntos) en comparación con las de *E. coli* de tipo natural (negro). Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DW/h. El punto A se refiere a la velocidad de producción de dodecanol al crecimiento máximo de una cepa diseñada por ingeniería genética según el diseño V_A y el punto B se refiere a la velocidad de producción de dodecanol mínima requerida para el crecimiento.

La figura 8 muestra las características de producción de LCA acoplada al crecimiento de los diseños I (puntos y rayas alternos), XII (rayas largas), XII_A (rayas cortas) y XII_B (puntos) en comparación con las de *E. coli* de tipo natural (negro). Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DW/h. El punto A se refiere a la velocidad de producción de dodecanol al crecimiento máximo de una cepa diseñada por ingeniería genética según el diseño XII_B y el punto B se refiere a la velocidad de producción de dodecanol mínima requerida para el crecimiento.

La figura 9a muestra la formación de dodecanol en el citosol basándose en la acetil CoA sintetasa que forma AMP para la formación de acetil CoA para la producción de dodecanol. Las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 9b muestra las envueltas de producción acoplada al crecimiento para la producción de dodecanol en *S. cerevisiae* en el escenario en el que se usa acetil CoA sintetasa para la producción de acetil CoA en el citosol. La curva negra muestra la envuelta de producción para la red de tipo natural en condiciones aerobias, y la curva gris

oscuro muestra las características de producción acoplada al crecimiento para la red mutante. Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DCW.h.

La figura 10a muestra la formación de dodecanol en el citosol basándose en la acetato CoA ligasa que forma ADP para la formación de acetil CoA para la producción de dodecanol. La flecha gris representa la adición de una enzima heteróloga. Las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 10b muestra las envueltas de producción acoplada al crecimiento para la producción de dodecanol en *S. cerevisiae* en el escenario en el que se emplea acetato CoA ligasa para la producción de acetil-CoA en el citosol. La curva negra muestra la envuelta de producción para la red de tipo natural en condiciones aerobias. La curva gris claro muestra el aumento en el espacio viable tras añadirse acetato CoA ligasa a la red y la curva gris oscuro muestra las características de producción acoplada al crecimiento para la red mutante en presencia de oxígeno. Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DCW.h.

La figura 11a muestra la formación de dodecanol en el citosol basándose en la acetaldehído deshidrogenasa acilante para la formación de acetil CoA para la producción de dodecanol. La flecha gris muestra una enzima heteróloga. Las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 11b muestra las envueltas de producción acoplada al crecimiento para la producción anaerobia de dodecanol en *S. cerevisiae*. La curva negra muestra las capacidades de producción para la red de tipo natural, la curva de puntos gris claro muestra las características de producción cuando se añade acetaldehído deshidrogenasa acilante a la red y la curva gris oscuro muestra el acoplamiento al crecimiento cuando se deleciona alcohol deshidrogenasa de la red aumentada. Obsérvese el aumento en el máximo teórico cuando la acetaldehído deshidrogenasa acilante es funcional. Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DCW.h.

La figura 12 muestra la formación de dodecanol en el citosol basándose en una piruvato deshidrogenasa citosólica para la producción de acetil CoA y NADH. Esto puede lograrse introduciendo una enzima citosólica heteróloga (mostrada en gris) o redirigiendo la enzima mitocondrial nativa al citosol. Las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 13 muestra la formación de dodecanol en el citosol basándose en una piruvato:NADP oxidorreductasa citosólica para la producción de acetil CoA y NADH. Esto puede lograrse introduciendo una enzima heteróloga en el citosol (mostrada en gris). Las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 14 muestra la formación de dodecanol en el citosol mediante la introducción de una piruvato formiato liasa heteróloga (mostrada en gris) en el citosol. Las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 15a muestra la formación de dodecanol en la mitocondria usando la piruvato deshidrogenasa para la formación de acetil-CoA. Las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 15b muestra las envueltas de producción acoplada al crecimiento para la producción de dodecanol en la mitocondria de *S. cerevisiae*. La curva negra muestra las capacidades de producción para la red de tipo natural en condiciones anaerobias y la curva gris oscuro muestra las características de producción en ausencia de oxígeno cuando se deleciona piruvato descarboxilasa de la red. Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DCW.h.

La figura 16 muestra la formación de dodecanol en la mitocondria usando la piruvato:NADP oxidorreductasa para la formación de acetil CoA. La flecha gris muestra la enzima heteróloga y las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 17 muestra la formación de dodecanol en la mitocondria usando la piruvato formiato liasa para la formación de acetil CoA. La flecha gris muestra la enzima heteróloga y las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 18 muestra la formación de dodecanol en la mitocondria añadiendo la acetaldehído deshidrogenasa acilante mitocondrial. La flecha gris muestra la(s) enzima(s) heteróloga(s) y las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 19a muestra la formación de dodecanol en la mitocondria usando la acetil CoA sintetasa para la formación de acetil CoA. La flecha gris muestra la(s) enzima(s) heteróloga(s) y las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

La figura 19b muestra las envueltas de producción acoplada al crecimiento para la producción de dodecanol en la mitocondria de *S. cerevisiae* cuando se forma acetil-CoA a través de la acetil-CoA sintetasa mitocondrial. La curva negra muestra la envuelta de producción para la red de tipo natural en condiciones aerobias, la curva gris oscuro claro muestra las características de producción cuando se han impuesto las delecciones en la red. El acoplamiento al crecimiento puede mejorarse adicionalmente (curva gris oscuro) cuando el flujo a través de la parte oxidativa de la ruta de pentosas fosfato disminuye. Se supone una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de DCW.h.

La figura 20 muestra la formación de dodecanol en la mitocondria usando la acetato CoA ligasa para la formación de acetil CoA. Las flechas grises muestran la(s) enzima(s) heteróloga(s) y las flechas de puntos representan el flujo de la mayoría del flujo de carbono en este escenario de producción.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere, en parte, a microorganismos recombinantes capaces de sintetizar los alcoholes primarios usando una ruta de reducción y síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA. Los microorganismos modificados de la divulgación también son capaces de secretar el alcohol primario resultante en los medios de cultivo o caldo de fermentación para manipulación y aislamiento adicional. Los microorganismos recombinantes de la divulgación también pueden modificarse por ingeniería genética para producir cantidades comerciales de una variedad de diferentes alcoholes primarios que tienen diferentes longitudes de cadena entre 4 (C4) y 24 (C24) o más átomos de carbono. La producción de alcoholes primarios a través de las rutas modificadas de la divulgación es particularmente útil porque da como resultado mayores rendimientos de producto y ATP que a través de rutas biosintéticas que se producen de manera natural tales como la ruta de síntesis de ácidos grasos dependiente de malonil-CoA bien documentada. Usar acetil-CoA como una unidad de extensión de C2 en lugar de proteína portadora de malonil-acilo (malonil-ACP) salva una molécula de ATP por flujo unitario de acetil-CoA que entra en el ciclo de elongación. El ciclo de elongación da como resultado acil-CoA en lugar de acil-ACP, y evita la necesidad de las reacciones de acil-CoA sintasa que consumen ATP para la producción de octanol y otros alcoholes primarios. Los organismos que producen alcohol primario de la divulgación pueden permitir además el uso de procesos biosintéticos para convertir materia prima renovable de bajo coste para la fabricación de productos químicos.

La invención utiliza una ruta de síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA heteróloga acoplada con una ruta de reducción de acil-CoA para formar especies de alcohol primario. El acoplamiento de estas dos rutas convertirá una fuente de carbono o energía en acetil-CoA, que se usa tanto como cebador como unidad de extensión en el ciclo de elongación biosintética. El ciclo de elongación incluye cetoacil-CoA tiolasa (o cetoacil-CoA aciltransferasa), 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa. Cada ciclo da como resultado la formación de una acil-CoA extendida por una unidad C2 en comparación con el sustrato de acil-CoA que entra en el ciclo de elongación. La longitud de las cadenas de carbono de los alcoholes primarios puede controlarse mediante enoil-CoA reductasa, cetoacil-CoA tiolasa y/o acil-CoA reductasa específicas de cadena. Los productos de acil-CoA con longitudes de cadena deseadas se canalizan en una ruta de reducción y se reducen a través de la combinación de acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa o el alcohol graso que forma acil-CoA reductasa para formar alcohol primario deseado. Estas etapas de reducción sirven como otro mecanismo para el control de la longitud de cadena, por ejemplo, a través del uso de acil-CoA reductasas específicas de la longitud de cadena.

Tal como se usa en el presente documento, el término "que no se produce de manera natural" cuando se usa en referencia a un organismo o microorganismo microbiano de la divulgación se pretende que 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 las especies de referencia, incluyendo cepas de tipo natural de las especies de referencia. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican polipéptidos metabólicos, otras adiciones de ácido nucleico, delecciones de ácido nucleico y/u otra alteración funcional del material genético microbiano. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones codificantes y fragmentos funcionales de las mismas, para polipéptidos heterólogos, homólogos o tanto heterólogos como homólogos para las especies de referencia. Las modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. Los polipéptidos metabólicos a modo de ejemplo incluyen enzimas dentro de una ruta biosintética de ácidos grasos independiente de malonil-CoA y enzimas dentro de una ruta de reducción de acilos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" cuando se usa en referencia a un organismo microbiano se pretende que signifique un organismo que está sustancialmente libre de al menos un componente tal como se encuentra en la naturaleza el organismo microbiano de referencia. El término incluye un organismo microbiano que se retira de algunos o todos los componentes tal como se encuentra en su medio natural. El término también incluye un organismo microbiano que se retira de algunos o todos los componentes ya que el organismo microbiano se encuentra en medios que no se producen de manera natural. Por tanto, un organismo microbiano aislado se separa parcial o completamente de otras sustancias tal como se encuentra en la naturaleza o tal como se hace crecer, almacena o subsiste en medios 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, los términos “microbiano”, “organismo microbiano” o “microorganismo” se pretende que signifique cualquier organismo que existe como célula microscópica que se incluye dentro de los dominios de Archaea, Bacteria o Eukarya. Por tanto, el término se pretende que abarque células u organismos procariotas o eucariotas que tienen un tamaño microscópico e incluye bacterias, arqueas y eubacterias de todas las especies así como microorganismos eucariotas tales como levadura y hongos. El término también incluye cultivos celulares de cualquier especie que pueda cultivarse para la producción de un producto bioquímico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “alcohol primario” se pretende que signifique un alcohol que tiene el radical hidroxilo conectado con un carbono primario. El término incluye un alcohol que presenta el grupo $-CH_2OH$ que puede oxidarse para formar un aldehído y ácido correspondientes que tienen el mismo número de átomos de carbono. Los alcoholes incluyen cualquiera de una serie de compuestos de hidroxilo, de los cuales los más sencillos derivan de hidrocarburos saturados, tienen la fórmula general $C_nH_{2n+1}OH$, e incluyen etanol y metanol. Los alcoholes primarios a modo de ejemplo incluyen butanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol, dodecanol, tetradecanol y hexadecanol.

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

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

“Exógeno” tal como se usa en el presente documento se pretende que signifique que la molécula de referencia o la actividad de referencia se introduce en el organismo microbiano huésped. Por tanto, el término tal como se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante se refiere a la introducción del ácido nucleico codificante en una forma expresable en el organismo microbiano. Cuando se usa en referencia a una actividad biosintética, el término se refiere a una actividad que se introduce en el organismo de referencia huésped. La fuente puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico codificante homólogo o heterólogo que expresa la actividad de referencia tras introducción en el organismo microbiano huésped. Por tanto, el término “endógeno” se refiere a una molécula o actividad de referencia que está presente en el huésped. De manera similar, el término, cuando se usa en referencia a la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la expresión de un ácido nucleico codificante contenida dentro del organismo microbiano. El término “heterólogo” se refiere a una molécula o actividad derivada de una fuente distinta de las especies de 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 divulgación puede utilizar o bien un ácido nucleico codificante heterólogo o bien homólogo, u ambos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “acoplado a crecimiento” cuando se usa en referencia a la producción de un producto bioquímico se pretende que signifique que la biosíntesis del producto bioquímico de referencia es un producto producido durante la fase de crecimiento de un microorganismo. “No acoplado a crecimiento” cuando se usa en referencia a la producción de un producto bioquímico se pretende que signifique que la biosíntesis del producto bioquímico de referencia es un producto producido durante una fase de no crecimiento de un microorganismo. La producción de un producto bioquímico puede ser opcionalmente obligatoria para el crecimiento del organismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “modificación metabólica” se pretende que se refiera a una reacción bioquímica que se altera de su estado que se produce de manera natural. Las modificaciones metabólicas pueden incluir, por ejemplo, eliminación de una actividad de reacción bioquímica mediante alteraciones funcionales de uno o más genes que codifican una enzima que participa en la reacción. En la tabla 1 se ilustran conjuntos de modificaciones metabólicas a modo de ejemplo. En la tabla 2 se ejemplifican reacciones individuales especificadas por tales modificaciones metabólicas y sus correspondientes complementos génicos para *Escherichia coli*. En la tabla 3 se ejemplifican reactivos y productos utilizados en estas reacciones.

Tal como se usa en el presente documento, el término “alteración génica” o equivalentes gramaticales de la misma, se pretende que signifique una alteración genética que hace que el producto génico codificado sea inactivo. La alteración genética puede ser, por ejemplo, delección de todo el gen, delección de una secuencia reguladora requerida para transcripción o traducción, delección de una porción del gen que da como resultado un producto génico truncado o mediante cualquiera de diversas estrategias de mutación que inactivan el producto génico codificado. Un método de alteración génica particularmente útil es delección génica completa porque reduce o elimina la aparición de reversiones genéticas en los microorganismos que no se producen de manera natural de la divulgación. El término “alteración génica” también se pretende que signifique una alteración genética que reduce la actividad de un

producto génico dado en relación con su actividad en un organismo de tipo natural. Esta atenuación de la actividad puede deberse a, por ejemplo, una delección en una porción del gen que da como resultado un producto génico truncado o cualquiera de las diversas estrategias de mutación que hacen que el producto génico codificado sea menos activo que su forma natural, reemplazo o mutación de la secuencia promotora que conduce a menos o menos eficaz expresión del gen, cultivo del organismo con una condición en la que el gen se expresa menos que en condiciones de cultivo normales, o introducción de moléculas de ARN antisentido que interactúan con moléculas de ARNm complementarias del gen y alteran su expresión.

Tal como se usa en el presente documento, el término “estable”, cuando se usa en referencia a producción acoplada al crecimiento de un producto bioquímico, se pretende que se refiera a un microorganismo que puede cultivarse durante más de cinco generaciones sin pérdida del acoplamiento entre crecimiento y síntesis bioquímica. Generalmente, la producción bioquímica acoplada al crecimiento estable será mayor de 10 generaciones, particularmente la producción bioquímica acoplada al crecimiento estable será mayor de aproximadamente 25 generaciones, y más particularmente, la producción bioquímica acoplada al crecimiento estable será mayor de 50 generaciones, incluyendo indefinidamente. La producción acoplada al crecimiento estable de un producto bioquímico puede lograrse mediante, por ejemplo, alteración de un gen que codifica una enzima que cataliza cada reacción dentro de un conjunto de modificaciones metabólicas. La estabilidad de producción acoplada al crecimiento de un producto bioquímico puede potenciarse a través de múltiples alteraciones, que reducen significativamente la probabilidad de múltiples reversiones compensatorias que se producen para cada actividad alterada.

Los expertos en la técnica comprenderán que las modificaciones metabólicas ejemplificadas en el presente documento se describen con referencia a genes de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* y sus correspondientes reacciones metabólicas. Sin embargo, dada la secuenciación de genoma completo de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de destreza en el área de la genómica, los expertos en la técnica serán capaces fácilmente de aplicar las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento a esencialmente todos los demás organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de *Escherichia coli* ejemplificadas en el presente documento pueden aplicarse fácilmente a otras especies incorporando las mismas o análogas alteraciones génicas en las otras especies. Tales alteraciones pueden incluir, por ejemplo, alteraciones genéticas de homólogos de especies, en general, y en particular, desplazamientos de genes ortólogos, parálogos o no ortólogos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “confiere producción” se refiere no solo a organismos que carecen de rutas metabólicas operacionales para la producción de LCA, sino también a organismos que pueden tener algún nivel de producción de LCA. Por tanto, un organismo que ya genera LCA puede beneficiarse de producción mejorada conferida al organismo mediante la alteración de uno o más genes.

Tal como se usa en el presente documento, el término “organismo eucariota” se refiere a cualquier organismo que tiene un tipo celular que tiene orgánulos especializados en el citoplasma y un núcleo unido a membrana que encierra material genético organizado en cromosomas. El término se pretende que abarque todos los organismos eucariotas incluyendo organismos eucariotas microbianos tales como levadura y hongos. El término también incluye cultivos celulares de cualquier especie eucariota que puede cultivarse para la producción de un producto bioquímico donde las especies eucariotas no han de ser un organismo microbiano. Un “organismo eucariota microbiano”, “organismo microbiano” o “microorganismo” se pretende que signifique cualquier organismo eucariota que existe como una célula microscópica que se incluye dentro del dominio de Eukarya.

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 de humano pueden considerarse ortólogos para la función biológica de hidrólisis de epóxidos. Los genes están relacionados por descendencia vertical cuando, por ejemplo, comparten similitud de secuencia en cantidad suficiente para indicar que son homólogos, o relacionados por evolución a partir de un ancestro común. Los genes también pueden considerarse ortólogos si comparten estructura tridimensional pero no necesariamente similitud de secuencia, en 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 proteínas con similitud de secuencia de aproximadamente el 25 % al 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos. Los genes que codifican proteínas que comparten una similitud de aminoácido menor del 25 % también pueden considerarse que han surgido por descendencia vertical si su estructura tridimensional también muestra similitudes. Miembros de la familia de enzimas serina proteasa, incluyendo activador de plasminógeno tisular y elastasa, se considera que han surgido por descendencia vertical a partir de un ancestro común.

Los ortólogos incluyen genes o sus productos génicos codificados que a través de, por ejemplo, evolución, han divergido en estructura o actividad global. Por ejemplo, cuando una especie codifica un producto génico que presenta dos funciones y cuando tales funciones se han separado en genes distintos en una segunda especie, los tres genes y sus correspondientes productos se considera que son ortólogos. Para la producción acoplada al crecimiento de un producto bioquímico, los expertos en la técnica entenderán que el gen ortólogo que alberga la actividad metabólica que va a alterarse se elige para la construcción del microorganismo que se produce de manera no natural. Un ejemplo de ortólogos que presentan actividades separables es cuando distintas actividades se han

separado en distintos productos génicos entre dos o más especies o dentro de una única especie. Un ejemplo específico es la separación de proteólisis de elastasa y proteólisis de plasminógeno, dos tipos de actividad serina proteasa, en moléculas distintas como activador de plasminógeno y elastasa. Un segundo ejemplo es la separación de 5'-3' exonucleasa micoplasmática y actividad de ADN polimerasa III de *Drosophila*. La ADN polimerasa de la primera especie puede considerarse un ortólogo de o bien la exonucleasa o bien la polimerasa, o ambas de la segunda especie y viceversa.

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

Un desplazamiento de gen no ortólogo es un gen no ortólogo de una especie que puede sustituir una función génica de referencia en una especie diferente. La sustitución incluye, por ejemplo, ser capaz de realizar sustancialmente la misma o una función similar en la especie de origen en comparación con la función de referencia en las diferentes especies. Aunque generalmente, un desplazamiento de gen no ortólogo será identificable como relacionado estructuralmente con un gen conocido que codifica la función de referencia, no obstante, los genes menos relacionados estructuralmente pero funcionalmente similares y sus correspondientes productos génicos se situarán 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 región de unión de un gen no ortólogo en comparación con un gen que codifica la función que se busca sustituir. Por tanto, un gen no ortólogo incluye, por ejemplo, un parálogo o un gen no relacionado.

Por tanto, en la identificación y construcción de los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación que tienen producción acoplada al crecimiento de un producto bioquímico, los expertos en la técnica entenderán que aplicar la enseñanza y guía proporcionadas en el presente documento a una especie particular que la identificación de modificaciones metabólicas debe incluir identificación y alteración de ortólogos. En la medida que estén presentes desplazamientos de genes parálogos y/o no ortólogos en el microorganismo de referencia que codifican una enzima que cataliza una reacción metabólica similar o sustancialmente similar, los expertos en la técnica también pueden alterar estos genes relacionados evolutivamente para garantizar que cualquier redundancia funcional en las actividades enzimáticas no provoquen un cortocircuito de las modificaciones metabólicas diseñadas.

Pueden determinarse desplazamientos de genes ortólogos, parálogos y no ortólogos mediante métodos bien conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la inspección de ácido nucleico o secuencias 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 para indicar que las proteínas están relacionadas mediante evolución a partir de un ancestro común. Los algoritmos bien conocidos para los expertos en la técnica, tales como Align, BLAST, Clustal W y otros comparan y determinan una similitud o identidad de secuencia en bruto, y también determinan la presencia o significancia de huecos en la secuencia a los que pueden asignarse un peso o puntuación. Tales algoritmos también se conocen en la técnica y son aplicables de manera similar para determinar similitud o identidad de secuencia de nucleótidos. Los parámetros para similitud suficiente para determinar el parentesco se computan basándose en métodos bien conocidos para calcular similitud estadística, o la oportunidad de encontrar una concordancia similar en un polipéptido aleatorio, y la significancia de la concordancia determinada. Una comparación informática de dos o más secuencias puede, si se desea, optimizarse también de manera visual por los expertos en la técnica. Puede esperarse que los productos génicos o proteínas relacionadas tengan una elevada similitud, por ejemplo, del 25 % al 100 % de identidad de secuencia. Las proteínas que no están relacionadas pueden tener una identidad que es esencialmente la misma que se esperaría que ocurriera de casualidad, si se escanea una base de datos de tamaño suficiente (aproximadamente el 5 %). Las secuencias entre el 5 % y el 24 % pueden o no representar suficiente homología para concluir que las secuencias comparadas están relacionadas. Pueden llevarse a cabo análisis estadísticos adicionales para determinar la significancia de tales concordancias dado el tamaño del conjunto de datos para determinar la relevancia de estas secuencias.

Los parámetros a modo de ejemplo para determinar el parentesco de dos o más secuencias usando el algoritmo BLAST, por ejemplo, pueden ser tal como se establece a continuación. Brevemente, pueden realizarse alineamientos de secuencia de aminoácidos usando BLASTP versión 2.0.8 (5 de enero de 1999) y los siguientes parámetros: Matriz: 0 BLOSUM62; hueco abierto: 11; extensión de hueco: 1; x_dropoff: 50; esperar: 10,0; tamaño de palabra: 3; filtro: puesto. Pueden realizarse alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos usando BLASTN versión 2.0.6 (16 de septiembre de 1998) y los siguientes parámetros: Coincidencia: 1; coincidencia errónea: -2; hueco abierto: 5; extensión de hueco: 2; x_dropoff: 50; esperar: 10,0; tamaño de palabra: 11; filtro: quitado. Los

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

Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación pueden contener alteraciones genéticas estables, que se refieren 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 mayores de 50 generaciones, incluyendo indefinidamente.

Los expertos en la técnica entenderán que las alteraciones genéticas, incluyendo modificaciones metabólicas ejemplificadas en el presente documento se describen con referencia a genes de *Euglena gracilis*, *E. coli* y *S. cerevisiae* y sus correspondientes reacciones metabólicas. Sin embargo, dada la secuenciación de genoma completo de una amplia variedad de organismos y el alto nivel de destreza en el área de la genómica, los expertos en la técnica serán capaces fácilmente de aplicar las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento a esencialmente todos los demás organismos. Por ejemplo, las alteraciones metabólicas de *E. coli* ejemplificadas en el presente documento pueden aplicarse fácilmente a otras especies incorporando el mismo o análogo ácido nucleico codificante de especies distintas de las especies de 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.

La divulgación proporciona un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de síntesis de ácidos grasos (FAS) independiente de malonil-CoA y una ruta de reducción de acilos que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA expresada en cantidades suficientes para producir un alcohol primario, dicha ruta de FAS independiente de malonil-CoA que comprende cetoacil-CoA aciltransferasa o cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa, dicha ruta de reducción de acilos que comprende una acil-CoA reductasa y una alcohol deshidrogenasa.

La síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA es un proceso metabólico usado por flagelado fotosintético tal como *Euglena gracilis* (Inui *et al.*, Euro. J. Biochem. 96:931-34 (1984). Estos organismos unicelulares presentan tanto características de las algas como protozoarias y, según las condiciones, pueden utilizar o bien energía lumínica (fotosíntesis) o energía química (alimentación) para procesos bioquímicos. En condiciones anaerobias, *E. gracilis* convierte paramilo, el polisacárido de reserva beta-1,2-glucano, en éster de cera con generación concomitante de ATP, un fenómeno denominado fermentación de éster de cera (Inui *et al.*, citado anteriormente, 1982; Inui *et al.*, Agricultural and Biological Chemistry 47:2669-2671 (1983)). La síntesis de ácidos grasos a través de la ruta independiente de malonil-CoA da como resultado una ganancia neta de ATP, mientras que otros sistemas de síntesis de ácidos grasos no pueden soportar la ganancia neta de ATP. También puede producirse ATP en condiciones aerobias (Inui *et al.*, Archives Biochemistry and Biophysics 237:423-29 (1985)).

En ausencia de oxígeno, se genera acetil-CoA a partir de piruvato por medio de un piruvato sensible a oxígeno:NADP⁺ oxidorreductasa (Inui *et al.*, citado anteriormente, 1984; Inui *et al.*, citado anteriormente, 1985; Inui *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics 280:292-98 (1990); Inui *et al.*, Journal of Biological Chemistry 262:9130-35 (1987)), y sirve como el aceptor de electrones terminal de oxidación de glucosa por medio de la síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA para formar éster de cera (Inui *et al.*, citado anteriormente, (1985)). *E. gracilis* contiene cinco sistemas de síntesis de ácidos grasos diferentes, incluyendo cuatro sistemas de síntesis de ácidos grasos ubicados en diferentes compartimentos, y el sistema de FAS independiente de malonil-CoA mitocondrial implicado en fermentación de éster de cera anaerobia (Hoffmeister *et al.*, J. of Biological Chemistry 280:4329-38 (2005)). El sistema de FAS independiente de malonil-CoA se ha demostrado que produce ácidos grasos C8-C18. Un ácido graso se reduce a alcohol, se esterifica con otro ácido graso, y se deposita en el citosol como ceras (Inui *et al.*, Febs Letters 150:89-93 (1982); Inui *et al.*, European Journal of Biochemistry 142:121-126 (1984)). La cera puede constituir aproximadamente el 50 % del líquido total en células crecidas oscuras (Rosenberg, A., Biochemistry 2:1148 (1963)). Una realización particularmente útil de la invención utiliza el sistema de síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA (FAS) en condiciones anaerobias para producir grandes cantidades de alcoholes usando las rutas biosintéticas modificadas descritas en el presente documento.

La ruta de síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA es similar a la reversión de oxidación de ácidos grasos y se denomina síntesis de ácidos grasos en la mitocondria o síntesis de ácidos grasos independiente de la proteína portadora de acilo (ACP) tal como se conoce en la técnica. En comparación con la síntesis de ácidos grasos dependiente de malonil-CoA (también conocida como síntesis de ácidos grasos dependiente de ACP; Smith *et al.*, Progress in Lipid Research 42:289-317 (2003); White *et al.*, Annual Review of Biochemistry 74:791-831 (2005)), existen varias diferencias. En primer lugar, se usa acetil-CoA como unidad de extensión en lugar de malonil-CoA. La utilización de acetil-CoA como sustrato de elongación en la ruta independiente de malonil-CoA elimina la necesidad del complejo acetil-CoA carboxilasa (ACC), que convierte acetil-CoA en malonil-CoA, y por tanto conserva una molécula de ATP por flujo unitario de acetil-CoA que entra en el ciclo de elongación. En segundo lugar, todos los

productos intermedios en el ciclo de elongación se unen a CoA en lugar de ACP. El ciclo de elongación puede incluir (i) cetoacil-CoA aciltransferasa (o cetoacil-CoA tiolasa, EC 2.3.1.16), (ii) 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (EC 1.1.1.35 y 1.1.1.211), (iii) enoil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.17 y 4.2.1.74), y (iv) enoil-CoA reductasa (EC 1.3.1.44 y 1.3.1.38). En tercer lugar, el producto del ciclo de elongación es acil-CoA, que puede utilizarse directamente por acil-CoA reductasa, seguido por una deshidrogenasa para conversión en alcohol, o mediante ácido graso que forma acil-CoA reductasa (FAR), que convierte acil-CoA directamente en alcohol. Por tanto, la tioesterasa y la acil-CoA sintasa no se requieren para la producción de alcoholes primarios, como es el caso con las rutas dependientes de malonil-CoA.

Por ejemplo, los microorganismos de la divulgación utilizan la ruta de síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA acoplada con la reducción del ácido graso para formar alcohol primario tal como se ilustra en la figura 1. El microorganismo puede modificarse adicionalmente para convertir, por ejemplo, materia prima renovable en acetil-CoA. En las rutas modificadas por ingeniería genética de la divulgación, puede usarse acetil-CoA tanto como cebador como unidad de extensión en el ciclo de elongación descrito anteriormente. Al final de cada ciclo de elongación, se forma una acil-CoA que es una unidad C2 mayor que la acil-CoA que entra en el ciclo de elongación. El acoplamiento de la ruta de síntesis anterior a una ruta de reducción produce los productos de alcohol primario de la divulgación. Particularmente útil es el acoplamiento de acil-CoA que tiene una longitud de cadena deseada con respecto a una ruta de reducción que usa la combinación de acil-CoA reductasa específica de longitud de cadena (EC 1.2.1.50) y alcohol deshidrogenasa (1.1.1.1) o el alcohol graso que forma acil-CoA reductasa (FAR, EC 1.1.1) para formar el alcohol primario deseado. La longitud de la cadena de carbono de los alcoholes primarios puede controlarse mediante enoil-CoA reductasa, cetoacil-CoA tiolasa y/o acil-CoA reductasa específicas de longitud de cadena.

Los microorganismos de la divulgación que tienen las rutas biosintéticas acopladas descritas anteriormente pueden producir alcoholes primarios a niveles muy altos. Por ejemplo, el rendimiento teórico máximo para octanol usando la ruta biosintética de ácido graso independiente de malonil-CoA y las energías asociadas se calcularon añadiendo las reacciones de síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA, acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa a una red estequiométrica metabólica de *E. coli* predictiva usando el sistema de modelado metabólico *in silico* conocido en la técnica como SimFeny™ (véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/173.547, presentada el 14 de junio de 2002, y en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US03/18838, presentada el 13 de junio de 2003). El modelo asume que la secreción de octanol no requiere energía. La tabla 4 muestra el rendimiento teórico máximo para octanol en condiciones tanto aerobias como anaerobias. La ruta biosintética de ácido graso independiente de malonil-CoA es mucho más eficiente en energía que las rutas de síntesis de ácidos grasos dependiente de malonil-CoA, y permite un rendimiento teórico máximo de 0,5 moles de octanol/moles de glucosa y rendimiento de ATP máximo de 2,125 moles/moles de glucosa en condiciones tanto aerobias como anaerobias.

Tabla 4: Comparación del rendimiento teórico máximo de octanol usando (1) la síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA y ruta de reducción de acilos y (2) la ruta y síntesis de ácidos grasos dependiente de ACP.

	Ruta de reducción y biosintética de ácido graso independiente de malonil-CoA		Ruta de reducción y biosintética de ácidos grasos típica	
	Anaerobia	Aerobia	Anaerobia	Aerobia
Rendimiento de octanol (moles/moles de glucosa)	0,5	0,5	0,375	0,48
Rendimiento de ATP máx. a rendimiento de octanol máx. (moles/moles de glucosa)	2,125	2,125	0	0

Un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la divulgación emplea combinaciones de reacciones metabólicas para producir de manera biosintética un alcohol primario objetivo o una mezcla objetivo de alcoholes primarios de la divulgación. La combinación de reacciones metabólicas puede modificarse por ingeniería genética en una variedad de diferentes alternativas para lograr la expresión exógena de una ruta de FAS independiente de malonil-CoA en cantidades suficientes para producir un alcohol primario. Los organismos microbianos que se producen de manera no natural expresarán al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA. En determinadas divulgaciones, los organismos microbianos que no se producen de manera natural se modificarán por ingeniería genética para expresar de manera exógena más de uno, incluyendo todos, los ácidos nucleicos que codifican algunas o todas de las enzimas para la ruta completa de las enzimas de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA. Algunas o todas las enzimas para la reducción de acilos también pueden expresarse de manera exógena. La expresión exógena debe estar a niveles suficientes para producir producto génico utilizable de manera metabólica y da como resultado la producción de un

alcohol primario objetivo o conjunto de alcoholes.

Las reacciones bioquímicas para la formación de alcoholes primarios a partir de un carbono u otra fuente de energía a través de una ruta de FAS independiente de malonil-CoA se muestran en la figura 1. La ruta de FAS independiente de malonil-CoA produce acil-CoA. La utilización concomitante de este producto intermedio para producir alcoholes primarios objetivo mediante una ruta de reducción de acilos también se muestra en la figura 1.

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

Organismos microbianos distintos de *Euglena gracilis* carecen generalmente de la capacidad de sintetizar acil-CoA a través de una ruta de FAS independiente de malonil-CoA. Además, no se conocen organismos que tienen todas las capacidades enzimáticas metabólicas requeridas que produzcan acil-CoA a partir de las enzimas descritas y rutas bioquímicas ejemplificadas en el presente documento. Más bien, microorganismos que tienen los constituyentes enzimáticos de ruta de FAS independiente de malonil-CoA operan para degradar compuestos de acil-CoA graso de cadena corta, media y larga a acetil-CoA. *E. gracilis*, que tiene una ruta de FAS independiente de malonil-CoA, utiliza esta ruta para producir acilglicerol, alcoholes de azúcar trihidroxilados, fosfolípidos, ésteres de cera y/o ácidos grasos. En cambio, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación generan acil-CoA como producto de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA y canalizan este producto en una ruta de reducción de acilos por medio de características termodinámicas favorables. La biosíntesis de productos de uso de los organismos que no se producen de manera natural de la divulgación no es solo particularmente útil para la producción de alcoholes primarios, también permite la biosíntesis adicional de compuestos usando acil-CoA y/o alcoholes primarios como reactivo intermedio.

Los organismos microbianos que producen alcohol primario que no se producen de manera natural de la divulgación se generan garantizando que un organismo microbiano huésped incluye capacidades funcionales para la síntesis bioquímica completa de una ruta biosintética de ácido graso independiente de malonil-CoA y para una ruta de reducción de acilos de la divulgación. Garantizar capacidades funcionales completas para ambas rutas conferirá capacidad de biosíntesis de alcohol primario al organismo microbiano huésped. Las enzimas que participan en una ruta de FAS independiente de malonil-CoA incluyen cetoacil-CoA aciltransferasa o cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa. Las enzimas que participan en una ruta de reducción de acilos incluyen una acil-CoA reductasa y una alcohol deshidrogenasa o una enzima que tiene actividad reductasa y deshidrogenasa dual.

Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación pueden producirse introduciendo ácidos nucleicos expresables que codifican una o más de las enzimas que participan en las rutas de reducción de acilo y/o FAS independiente de malonil-CoA. Según el organismo microbiano huésped elegido para la biosíntesis, pueden expresarse ácidos nucleicos para algunas o todas de estas rutas biosintéticas. Por ejemplo, si un huésped elegido es deficiente en todas las enzimas en la ruta de FAS independiente de malonil-CoA, entonces se introducen ácidos nucleicos expresables para cada una de las cuatro enzimas cetoacil-CoA aciltransferasa o cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa en el huésped para posterior expresión exógena. Alternativamente, por ejemplo, si el huésped elegido es deficiente en menos de las cuatro enzimas anteriores, entonces todo lo que se necesita es expresar ácidos nucleicos que codifican las enzimas deficientes. Por ejemplo, si un huésped es deficiente en 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa, puede modificarse por ingeniería genética una ruta funcionalmente completa de FAS independiente de malonil-CoA mediante introducción de ácidos nucleicos que codifican estas dos enzimas.

De manera similar, cuando la maquinaria biosintética del huésped endógeno está completa para una ruta de reducción de acilos, entonces la modificación genética es innecesaria. Sin embargo, si las capacidades del huésped son deficientes o bien en actividades acil-CoA reductasa y/o alcohol deshidrogenasa, o bien ambas, entonces se necesita la introducción de la actividad deficiente mediante expresión de un ácido nucleico exógeno codificante. Por consiguiente, según los constituyentes de la rutas de reducción de acilos y FAS independientes de malonil-CoA de un organismo microbiano huésped seleccionado, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación incluirán al menos un ácido nucleico que codifica la ruta de FAS independiente de malonil-CoA expresado de manera exógena y hasta los seis ácidos nucleicos que codifican la rutas de reducción de acilos y FAS independientes de malonil-CoA.

Dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que el número de ácidos nucleicos codificantes para introducir en una forma expresable será paralelo a las deficiencias de la vía de reducción de acilos y FAS independiente de malonil-CoA del organismo microbiano huésped seleccionado. Por tanto, un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la divulgación puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis ácidos nucleicos codificantes que codifican las enzimas anteriores que constituyen la ruta de FAS independiente de malonil-CoA, una ruta de reducción de acilos o ambas, las rutas biosintéticas de reducción de acilos y FAS independientes de malonil-CoA. En algunas divulgaciones, los organismos microbianos que no se producen de manera natural también pueden incluir otras modificaciones genéticas que facilitan u optimizan la biosíntesis de acil-CoA y/o alcohol primario o que confieren otras funciones útiles al organismo microbiano huésped. Una de estas otras funcionalidades puede incluir, por ejemplo, aumento de la síntesis de uno o más precursores de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA tales como acetil-CoA, β -cetoacil-CoA, β -hidroxiacil-CoA, *trans*-2-enoil-CoA y/o aldehído graso.

En algunas divulgaciones, un organismo microbiano que no se produce de manera natural generado a partir de un huésped que contiene la capacidad enzimática para sintetizar acil-CoA a través de una ruta de FAS independiente de malonil-CoA, o que tiene la capacidad para catalizar una o más de las etapas enzimáticas dentro de la ruta de reducción de acilos y/o FAS independiente de malonil-CoA. En estas divulgaciones específicas puede ser útil aumentar la síntesis o acumulación de un producto de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA o un producto de la ruta de reducción de acilos para, por ejemplo, conducir de manera eficaz reacciones de la ruta de reducción de acilos y/o FAS independiente de malonil-CoA hacia la producción de alcohol primario. Pueden lograrse síntesis o acumulación aumentadas mediante, por ejemplo, sobreexpresión de ácidos nucleicos que codifican una o más de las enzimas de la ruta de reducción de acilos y/o FAS independiente de malonil-CoA descritas anteriormente. La sobreexpresión de la enzima o enzimas de rutas deseadas puede producirse, por ejemplo, a través de la expresión exógena del gen o genes endógenos, o a través de la expresión exógena de un gen o genes heterólogos. Por tanto, pueden generarse fácilmente organismos que se producen de manera natural para que sean organismos microbianos que producen de manera no natural alcohol primario de la divulgación a través de la sobreexpresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco o los seis ácidos nucleicos que codifican enzimas de la ruta de reducción de acilos y/o FAS independiente de malonil-CoA. Además, puede generarse un organismo que se produce de manera no natural mediante mutagénesis de un gen endógeno que da como resultado un aumento en la actividad de una enzima en las rutas biosintéticas de reducción de acilo y/o FAS independientes de malonil-CoA.

En divulgaciones particularmente útiles, se emplea la expresión exógena de los ácidos nucleicos codificantes. La expresión exógena confiere la capacidad para personalizar la expresión y/o elementos reguladores al huésped y aplicación para lograr un nivel de expresión deseado que lo controla el usuario. Sin embargo, la expresión endógena también puede utilizarse en otras realizaciones tales como retirando un efector regulador negativo o inducción del promotor del gen cuando se une a un promotor inducible u otro elemento regulador. Por ejemplo, la activación de *fadB*, un gen de *E. coli* que tiene actividad de FAS independiente de malonil-CoA correspondiente a actividades 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa puede lograrse mediante alteración genética de un regulador negativo, *fadR*, y coexpresión de una cetotilasa heteróloga (*phaA* de *Ralstonia eutropha*; Sato *et al.*, Journal of Bioscience and Bioengineering 103:38-44 (2007)). Por tanto, un gen endógeno que tiene un promotor inducible que se produce de manera natural puede regularse por incremento proporcionando el agente de inducción apropiado, o la región reguladora de un gen endógeno puede modificarse por ingeniería genética para incorporar un elemento regulador inducible, permitiendo de ese modo la regulación de expresión aumentada de un gen endógeno en un momento deseado. De manera similar, un promotor inducible puede incluirse como elemento regulador para un gen exógeno introducido en un organismo microbiano que no se produce de manera natural.

Además, por ejemplo, si una enzima o enzimas endógenas operan en una dirección inversa a la ruta deseada de FAS independiente de malonil-CoA, pueden realizarse modificaciones genéticas para atenuar o eliminar tales actividades. Por ejemplo, dentro de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA, las etapas de cetotilasa, deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa etapas son reversibles mientras que la etapa de enoil-CoA reductasa es principalmente oxidativa en condiciones fisiológicas (Hoffmeister *et al.*, Journal of Biological Chemistry 280:4329-4338 (2005); Campbell, J. W. y J. E. Cronan, Jr., J Bacteriol. 184:3759-3764 (2002)). Para lograr la reducción de un producto intermedio de 2-enoil-CoA, puede introducirse una modificación genética para atenuar o eliminar la reacción oxidativa inversa.

Las fuentes de ácidos nucleicos codificantes una enzima de reducción de acilos y/o FAS independiente de malonil-CoA pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie en la que el producto génico codificado es capaz de catalizar la reacción de referencia. Tales especies incluyen tanto organismos procariotas y eucariotas incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias, incluyendo arqueas y eubacterias, y eucariotas, incluyendo levadura, planta, insecto, animal y mamífero, incluyendo humano. Por ejemplo, los organismos microbianos que tienen producción biosintética de alcohol primario se ejemplifican en el presente documento con referencia a un huésped de *E. coli*. Sin embargo, con la secuencia genómica completa disponible para ahora más de 550 especies (con más de la mitad de estas disponibles en bases de datos públicas tales como el NCBI), incluyendo 395 genomas de microorganismos y una variedad de genomas de levadura, hongo, planta y mamífero, la identificación de genes que codifican la actividad biosintética de reducción de acilo y/o FAS independiente de malonil-CoA requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes, incluyendo por ejemplo, desplazamientos de genes homólogos, ortólogos,

parálogos y no ortólogos de genes conocidos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos es rutina y se conoce bien en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de alcoholes primarios de la divulgación descrita en el presente documento con referencia a un organismo particular tal como *E. coli* pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos, incluyendo organismos procariotas y eucariotas por igual. Dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica conocerán que una alteración metabólica ejemplificada en un organismo puede aplicarse por igual a otros organismos.

En algunos casos, tales como cuando una enzima o ruta constituyente de FAS independiente de malonil-CoA alternativa existe en una especie no relacionada, la biosíntesis de alcohol primario puede conferirse a las especies del huésped mediante, por ejemplo, expresión exógena de un parólogo o parálogos de las especies no relacionadas que cataliza una reacción metabólica similar, aún no idéntica para reemplazar la reacción de referencia. Dado que existen determinadas diferencias entre redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la técnica entenderán que puede diferir el uso de genes actual entre diferentes organismos. Sin embargo, dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica también entenderán que las enseñanzas y métodos de la divulgación pueden aplicarse a todos los organismos microbianos usando las alteraciones metabólicas análogas a las ejemplificadas en el presente documento para construir un organismo microbiano en una especie de interés que sintetizarán los productos de alcohol primario de la divulgación.

Los ácidos nucleicos codificantes y especies que pueden usarse como fuentes para conferir capacidad de la ruta de reducción de acilos y/o FAS independiente de malonil-CoA a un organismo microbiano huésped se ejemplifican adicionalmente a continuación. En una divulgación a modo de ejemplo, los genes *fadA* y *fadB* codifican un complejo de múltiples enzimas que presenta tres actividades constituyentes de la ruta de FAS independiente de actividades malonil-CoA, concretamente, cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa (Nakahigashi, K. y H. Inokuchi, *Nucleic Acids Research* 18:4937 (1990); Yang *et al.*, *Journal of Bacteriology* 173:7405-7406 (1991); Yang *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 265:10424-10429 (1990); Yang *et al.*, *Biochemistry* 30:6788-6795 (1990)). Los genes *fadI* y *fadJ* codifican actividades similares que pueden sustituir los genes que confieren FAS independientes de malonil-CoA anteriores *fadA* y *fadB*. Estos genes se expresan de manera natural en condiciones anaerobias (Campbell y Cronan, citado anteriormente, (2002)). Las secuencias de ácido nucleico para cada uno de los genes *fad* anteriores se conocen bien en la técnica y puede accederse a ellas en las bases de datos públicas tales como Genbank usando los siguientes números de registro.

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

Otros genes a modo de ejemplo para la etapa de cetotiolasa incluyen *atoB* que pueden catalizar la condensación reversible de 2 moléculas de acetil-CoA (Sato *et al.*, citado anteriormente, 2007), y su homólogo *yqeF*. Genes no de *E. coli* que pueden usarse incluyen *phaA* de *R. eutropha* (Jenkins, L. S. y W. D. Nunn. *Journal of Bacteriology* 169:42-52 (1987)), y las dos cetotilasas, *thiA* y *thiB*, de *Clostridium acetobutylicum* (Winzer *et al.*, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2:531-541 (2000)). Las secuencias para estos genes pueden encontrarse en los siguientes números de registro de Genbank:

<i>atoB</i>	NP_416728.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>yqeF</i>	NP_417321.2	<i>Escherichia coli</i>
<i>phaA</i>	YP_725941	<i>Ralstonia eutropha</i>
<i>thiA</i>	NP_349476.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>thiB</i>	NP_149242.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

Un gen a modo de ejemplo de *E. coli* que puede usarse para conferir actividad de transformación de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa es *paaH* (Ismail *et al.*, *European Journal of Biochemistry* 270:3047-3054 (2003)). Los genes no de *E. coli* aplicables para conferir esta actividad incluyen AA072312.1 de *E. gracilis* (Winkler *et al.*, *Plant Physiology* 131:753-762 (2003)), *paaC* de *Pseudomonas putida* (Olivera *et al.*, *PNAS USA* 95:6419-6424 (1998)), *paaC* de *Pseudomonas fluorescens* (Di Gennaro *et al.*, *Archives of Microbiology* 188:117-125 (2007)), y *hbd* de *C. acetobutylicum* (Atsumi *et al.*, *Metabolic Engineering* (2007) y Boynton *et al.*, *Journal of Bacteriology* 178:3015-3024 (1996)). Las secuencias para cada uno de estos genes a modo de ejemplo pueden encontrarse en los siguientes números de registro de Genbank:

<i>paaH</i>	NP_415913.1	<i>Escherichia coli</i>
	AA072312.1	<i>Euglena gracilis</i>

<i>paaC</i>	NP_745425.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaC</i>	ABF82235.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>hbd</i>	NP_349314.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

Los genes a modo de ejemplo que codifican la etapa de enoil-CoA hidratasa incluyen, por ejemplo, *maoC* (Park y Lee, Journal Bacteriology 185:5391-5397 (2003)), *paaF* (Ismail *et al.*, European Journal of Biochemistry 270:3047-3054 (2003); Park y Lee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116:335-346 (2004) y Park y Yup, Biotechnol. Bioeng. 86:681-686 (2004)), y *paaG* (Ismail *et al.*, European Journal of Biochemistry 270:3047-3054 (2003); Park y Lee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116:335-346 (2004) y Park y Yup, Biotechnol. Bioeng. 86:681-686 (2004)). Otros genes que pueden usarse para producir el producto génico que cataliza esta etapa, por ejemplo, *paaA*, *paaB*, y *paaN* de *P. putida* (Olivera *et al.*, PNAS USA 95:6419-6424 (1998)) y *P. fluorescens* (Di Gennaro *et al.*, Archives of Microbiology 188:117-125 (2007)). También puede usarse el producto génico de *crt* de *C. acetobutylicum* (Atsumi *et al.*, Metabolic Engineering (2007) y Boynton *et al.*, Journal of Bacteriology 178: 3015-3024 (1996)). Las secuencias para cada uno de estos genes a modo de ejemplo pueden encontrarse en los siguientes números de registro de Genbank:

<i>maoC</i>	NP_415905.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaF</i>	NP_415911.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaG</i>	NP_415912.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>paaA</i>	NP_745427.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaA</i>	ABF82233.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>paaB</i>	NP_745426.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaB</i>	ABF82234.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>paaN</i>	NP_745413.1	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>paaN</i>	ABF82246.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>crt</i>	NP_349318.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

Un gen a modo de ejemplo que puede introducirse en un organismo microbiano que no se produce de manera natural de la divulgación para conferir actividad enoil-CoA reductasa es la enoil-CoA reductasa mitocondrial de *E. gracilis* Hoffmeister *et al.*, citado anteriormente (2005)). Un constructo derivado de esta secuencia tras la retirada de su secuencia líder de direccionamiento mitocondrial se ha clonado y expresado en *E. coli*. Este enfoque para expresión heteróloga de polipéptidos dirigidos a membrana en una forma soluble 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. También puede emplearse un homólogo próximo de este gen, TDE0597, del procariota *Treponema denticola* para conferir actividad enoil-CoA reductasa (Tucci y Martin, FEBS Letters 581:1561-1566 (2007)). La butiril-CoA deshidrogenasa, codificada por *bcd* de *C. acetobutylicum*, es una enzima a modo de ejemplo adicional que puede usarse para conferir actividad enoil-CoA reductasa a un organismo microbiano huésped de la divulgación (Atsumi *et al.*, Metabolic Engineering (2007) y Boynton *et al.*, Journal of Bacteriology 178: 3015-3024 (1996)). Alternativamente, pueden obtenerse genes de *E. coli* que presentan esta actividad usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Mizugaki *et al.*, Chemical & Pharmaceutical Bulletin 30:206-213 (1982) y Nishimaki *et al.*, Journal of Biochemistry 95:1315-1321 (1984)). Las secuencias para cada uno de los genes anteriores a modo de ejemplo pueden encontrarse en los siguientes números de registro de Genbank:

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

Existen al menos tres enzimas enoil-CoA reductasa mitocondriales en *E. gracilis* que son aplicables de manera similar para su uso en la divulgación. Cada enzima enoil-CoA reductasa presenta una preferencia de longitud de cadena única (Inui *et al.*, European Journal of Biochemistry 142:121-126 (1984)), que es particularmente útil para dictar la longitud de cadena de los productos de alcohol primario deseados de la divulgación. ELL00002199, ELL00002335 y ELL00002648 de EST, que se anotan todos como trans-2-enoil-CoA reductasas mitocondriales, pueden usarse para aislar estos genes de enoil-CoA reductasa adicionales tal como se describe a continuación.

Los expertos en la técnica también pueden obtener ácidos nucleicos que codifican cualquiera o todas de las enzimas de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA o ruta de reducción de acilos mediante clonación usando secuencias conocidas de fuentes disponibles. Por ejemplo, cualquiera o todos de los ácidos nucleicos codificantes para la ruta de FAS independiente de malonil-CoA pueden obtenerse fácilmente usando métodos bien conocidos en la técnica de *E. gracilis* puesto que esta ruta se ha caracterizado bien en este organismo. Pueden aislarse ácidos nucleicos codificantes de *E. gracilis* de, por ejemplo, una biblioteca de ADNc de *E. gracilis* usando sondas de secuencia conocida. Las sondas pueden diseñarse con secuencias de ADN completo o parcial a partir de las siguientes secuencias de EST de la base de datos de secuencias disponible públicamente TBestDB

(<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca>). Los ácidos nucleicos generados a partir de este proceso pueden insertarse en un vector de expresión apropiado y transformarse en *E. coli* u otros microorganismos para generar organismos de producción de alcohol primario de la divulgación.

5 cetoacil-CoA aciltransferasa (o cetoacil-CoA tiolasa)

ELL00002550

ELL00002493

10

ELL00000789

3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa

15 ELL00000206

ELL00002419

ELL00006286

20

ELL00006656

enoil-CoA hidratasa

25 ELL00005926

ELL00001952

ELL00002235

30

ELL00006206

enoil-CoA reductasa

35 ELL00002199

ELL00002335

ELL00002648

40

Alternativamente, las secuencias de EST anteriores pueden usarse para identificar polipéptidos homólogos en GenBank mediante búsqueda BLAST. Los polipéptidos homólogos resultantes y sus correspondientes secuencias génicas proporcionan ácidos nucleicos codificantes adicionales para la transformación en *E. coli* u otros microorganismos para generar los organismos que producen alcohol primario de la divulgación. A continuación se indican polipéptido homólogo a modo de ejemplo y sus números de registro génicos en GenBank que son aplicables para su uso en los organismos que no se producen de manera natural de la divulgación.

45

cetoacil-CoA aciltransferasa (o cetoacil-CoA tiolasa)

50 YP_001530041 *Desulfococcus oleovorans* Hxd3

ZP_02133627 *Desulfatibacillum alquenivorans* AK-01

ZP_01860900 *Bacillus* sp. SG-1

55

YP_001511817 *Alkaliphilus oremlandii* OhILAs

NP_781017 *Clostridium tetani* E88

60 YP_001646648 *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4

YP_001322360 *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF

YP_001397054 *Clostridium kluyveri* DSM 555

65

NP_070026 *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304

ES 2 703 775 T3

	YP_001585327	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616
	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	
5	AA072312	<i>Euglena gracilis</i>
	XP_001655993	<i>Aedes aegypti</i>
10	NP_001011073	<i>Xenopus tropicalis</i>
	NP_001003515	<i>Danio rerio</i>
	XP_973042	<i>Tribolium castaneum</i>
15	XP_001638329	<i>Nematostella vectensis</i>
	CAG11476	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
20	XP_787188	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
	XP_001749481	<i>Monosiga brevicollis</i> MX1
	NP_509584	<i>Caenorhabditis elegans</i>
25	XP_572875	<i>Cryptococcus neoformans</i> var
	enoil-CoA hidratasa	
30	XP_844077	<i>Trypanosoma brucei</i>
	XP_802711	<i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL Brener
	XP_806421	<i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL Brener.
35	YP_001669856	<i>Pseudomonas putida</i> GB-1
	YP_641317	<i>Mycobacterium</i> sp. MCS
40	YP_959434	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8
	ABK24445	<i>Picea sitchensis</i>
	XP_640315	<i>Dictyostelium discoideum</i>
45	YP_633978	<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622
	YP_467905	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42
50	YP_419997	<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1
	YP_001172441	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501
	enoil-CoA reductasa.	
55	XP_642118	<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4
	XP_001639469	<i>Nematostella vectensis</i>
60	XP_001648220	<i>Aedes aegypti</i>
	XP_974428	<i>Tribolium castaneum</i>
	XP_535334	<i>Canis lupus familiaris</i> (perro)
65	NP_001016371	<i>Xenopus tropicalis</i>

	XP_320682	<i>Anopheles gambiae</i> cepa PEST
5	ZP_01645699	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	XP_001679449	<i>Caenorhabditis briggsae</i> AF16
	ZP_01443601	<i>Roseovarius</i> sp. HTCC2601
10	XP_395130	<i>Apis mellifera</i>
	XP_001113746	<i>Macaca mulatta</i>
15	ZP_01485509	<i>Vibrio cholerae</i>
	V51 ZP_02012479	<i>Opitutaceae bacterium</i> TAV2
	ZP_01163033	<i>Photobacterium</i> sp. SKA34
20	YP_267463	<i>Colwellia psychrerythraea</i> 34H
	ZP_01114282	<i>Reinekea</i> sp. MED297
25	ZP_01732824	<i>Flavobacteria bacterium</i> BAL38

Tal como se describió previamente, después del ciclo de elongación independiente de malonil-CoA, la acil-CoA resultante puede reducirse para producir un alcohol primario mediante o bien una única enzima o bien par de enzimas que presentan actividades acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa. Los genes a modo de ejemplo que codifican enzimas para catalizar la reducción de una acil-CoA a su correspondiente aldehído incluyen *Acinetobacter calcoaceticus acrl* que codifica una acil-CoA reductasa grasa (Reiser y Somerville, Journal of Bacteriology 179:2969-2975 (1997)), *Acinetobacter* sp. M-1 acil-CoA reductasa grasa (Ishige *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002)), y el gen *sucD* de *Clostridium kluyveri* (Sohling y Gottschalk, Journal Bacteriology 178:871-880 (1996)).

35	<i>acrl</i> YP_047869.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	AAC45217	<i>Acinetobacter baylyi</i>
	BAB85476.1	<i>Acinetobacter</i> sp. Cepa M-1
	<i>sucD</i> P38947.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

Los genes a modo de ejemplo que codifican enzimas que catalizan la conversión de un aldehído en alcohol (es decir, alcohol deshidrogenasa o aldehído reductasa de manera equivalente) incluyen *alrA* que codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena media 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)), y *yqhD* de *E. coli* que tiene preferencia por moléculas más largas que C3 (Sulzenbacher *et al.*, Journal de Molecular Biology 342:489-502 (2004)).

45	<i>alrA</i> BAB12273.1	<i>Acinetobacter</i> sp. Cepa M-1
	<i>ADH2</i> NP_014032.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>yqhD</i> NP_417484.1	<i>Escherichia coli</i>

Alternativamente, la acil-CoA grasa puede reducirse en una etapa mediante un alcohol graso que forma acil-CoA reductasa o cualquier otra enzima con actividad acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa dual. Por ejemplo, *FAR* de jojoba (*Simmondsia chinensis*) codifica una acil-CoA reductasa grasa de formación de alcohol y su sobreexpresión en *E. coli* dio como resultado actividad FAR y la acumulación de alcohol graso (Metz *et al.*, Plant Physiology 122:635-644 (2000)). La reductasa con especificidades de longitud de cadena de sustrato estrecho también funcionará como control adicional para la longitud de cadena del producto. Los candidatos génicos adicionales incluirán *E. coli adhE* (Kessler *et al.*, FEBS Letters 281:59-63 (2000)) y *C. acetobutylicum bdh I* y *bdh II* (Walter *et al.*, Journal of Bacteriology 174:7149-7158 (1992)) que pueden reducir acetil-CoA y butiril-CoA en etanol y butanol, respectivamente.

60	<i>FAR</i> AAD38039.1	<i>Simmondsia chinensis</i>
	<i>adhE</i> NP_415757.1	<i>Escherichia coli</i>
	<i>bdh I</i> NP_349892.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
	<i>bdh II</i> NP_349891.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>

Además, las secuencias de ácido nucleico de *E. gracilis* que codifican enzimas para la etapa de reducción pueden obtenerse y transformarse en un huésped tal como se describió previamente para la ruta de FAS independiente de malonil-CoA que codifica ácidos nucleicos aislados de una biblioteca de ADNc de *E. gracilis* usando sondas,

diseñados con secuencias de ADN completo o parcial de las siguientes secuencias EST de TBestDB (<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca>) puede realizarse tal como se describió previamente.

aldehído deshidrogenasa

ELL00002572

ELL00002581

ELL00000108

Además de los ácidos nucleicos codificantes a modo de ejemplo anteriores, también pueden introducirse ácidos nucleicos distintos de aquellos dentro de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA y/o ruta de reducción de acilos de la divulgación, en un organismo huésped para producción adicional de alcoholes primarios. Por ejemplo, los genes *BktB* y *PhbB* de *Ralstonia eutropha* catalizan la condensación de butiril-CoA y acetil-CoA formando β -ceto-hexanoil-CoA y la reducción de β -ceto-hexanoil-CoA a 3-hidroxi-hexanoil-CoA (Fukui *et al.*, Biomacromolecules 3:618-624 (2002)). Para mejorar la producción de alcoholes primarios, pueden expresarse secuencias de ADN exógeno que codifican estas enzimas específicas en el huésped de producción de interés. Además, las enzimas descritas anteriormente pueden someterse a evolución dirigida para generar versiones mejoradas de estas enzimas con alta actividad y alta especificidad de sustrato. También puede utilizarse un enfoque similar con cualquiera o todas de las demás etapas enzimáticas en las rutas de producción de alcohol primario de la divulgación para, por ejemplo, mejorar la actividad enzimática y/o especificidad y/o para generar alcoholes de cadena larga de una longitud o longitudes de cadena predeterminadas.

Además, pueden aplicarse acil-CoA graso y alcoholes grasos generados tal como se describió anteriormente para producir ésteres de diversas longitudes. Estos ésteres pueden formarse entre: 1) acil-CoA graso y alcoholes de cadena corta tales como metanol, etanol, propanol, etc.; 2) alcoholes grasos y acil-CoA de cadena corta tal como formil-CoA, acetil-CoA y propionil-CoA, etc.; 3) acil-CoA graso y alcoholes grasos tal como se muestra en las siguientes ecuaciones.

acil-CoA graso + alcoholes de cadena corta \rightarrow ésteres grasos + CoA

alcoholes grasos + acil-CoA de cadena corta \rightarrow ésteres grasos + CoA

acil-CoA graso + alcoholes grasos = cera \rightarrow CoA

Los alcoholes grasos (o de cadena larga) pueden sintetizarse de manera intracelular mediante las rutas descritas en el presente documento o pueden añadirse al medio y absorberse por el microbio modificado por ingeniería genética. De manera similar, pueden añadirse alcoholes de cadena corta al medio o producirse de manera endógena. Etanol es un alcohol de cadena corta a modo de ejemplo que se produce de manera natural por muchos microorganismos incluyendo *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los ésteres grasos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ésteres metílicos de ácido graso (FAME), ésteres etílicos de ácido graso (FAEE), ésteres acetílicos y cera. Tales moléculas tienen amplias aplicaciones incluyendo en alimentos, cuidado personal, recubrimientos, tensioactivos y biodiésel (Gerhard Knothe, Energy & Fuels 2008, 22, 1358-1364). Los ésteres grasos, en este contexto, se diferencian de la cera por el tamaño de la cadena de hidrocarburo en cada lado del enlace éster.

Las ceras tienen hidrocarburos de cadena larga en cada lado del enlace éster, mientras que los ésteres grasos tienen un hidrocarburo de cadena corta y uno de cadena larga en cada lado del enlace éster, respectivamente.

Las reacciones para producir estos ésteres pueden catalizarse mediante enzimas con actividades acil-CoA:alcohol transacilasa. Las enzimas a modo de ejemplo para catalizar la formación de ésteres grasos incluyen la acil-CoA:alcohol graso aciltransferasa (éster sintasa de cera, WS, EC 2.3.1.75) y acetil-CoA:alcohol O-acetiltransferasa (EC 2.3.1.84). Los genes a modo de ejemplo que codifican estas enzimas incluyen *Acinetobacter* sp. ADP1 *atfA* que codifica una enzima bifuncional con actividades tanto éster de cera sintasa (WS) como acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (Kalscheuer *et al.* AJ Biol Chem 2003, 278: 8075-8082.); el gen AAD38041 de *Simmondsia chinensis* que codifica una WS requerida para la acumulación de ceras en semillas de jojoba (Lardizabal *et al.* Plant Physiology 2000, 122: 645-655.); *Alcanivorax borkumensis atfA1* y *atfA2* que codifican enzimas WS/DGAT bifuncionales (Kalscheuer *et al.* J Bacteriol 2007, 189: 918-928.); *Fragaria x ananassa* AAT que codifica una alcohol acetiltransferasa (Noichinda *et al.* Food Sci Technol Res 1999, 5: 239-242.); *Rosa hybrid cultivar* AAT1 que codifica una alcohol acetiltransferasa (Guterman *et al.* Plant MolBiol 2006, 60: 555-563.); y *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 y ATF2 que codifican alcohol acetiltransferasas (Mason *et al.* Yeast 2000, 16: 1287-1298.).

<i>atfA</i>	Q8GGG1	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1
	AAD38041	<i>Simmondsia chinensis</i>
<i>atfA1</i>	YP_694462	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2
<i>atfA2</i>	YP_693524	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2
AAT	AAG13130	<i>Fragaria x ananassa</i>
AAT1	Q5I6B5	<i>Rosa hybrid cultivar</i>
ATF1	P40353	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATF2	P53296	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Pueden seleccionarse organismos microbianos huésped de, y los organismos microbianos que no se producen de manera natural generarse en, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a procesos de fermentación. Las bacterias a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *E. coli*, *Rhodococcus opacus*, *Ralstonia eutropha*, *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*, *Pseudomonas putida* y *E. gracilis*. Levaduras u hongos a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Pichia pastoris*.

Pueden realizarse métodos para construir y someter a prueba los niveles de expresión de un huésped de producción de alcohol primario que se produce de manera no natural, por ejemplo, mediante métodos recombinantes y de detección bien conocidos en la técnica. Tales métodos pueden encontrarse descritos en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Baltimore, MD (1999). Por ejemplo, pueden introducirse ácidos nucleicos que codifican enzimas en la ruta de FAS independiente de malonil-CoA y/o de reducción de acilos de manera estable o transitoria en una célula huésped usando técnicas bien conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, conjugación, electroporación, transformación química, transducción, transfección y transformación por ultrasonidos. Para la expresión exógena en *E. coli* u otras células procariotas, por ejemplo, los genes mitocondriales codificarán señales de direccionamiento N-terminal, que pueden retirarse antes de la transformación en células huésped. Para la expresión exógena en levadura u otras células eucariotas, los genes pueden expresarse en el citosol sin la adición de la secuencia de direccionamiento, o alternatively, pueden dirigirse a la mitocondria con la adición de señal de direccionamiento mitocondrial funcional en el organismo huésped. Además, los genes pueden someterse a optimización de codones con técnicas bien conocidas en la técnica, para lograr expresión óptima del uno o más productos génicos de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA y/o de reducción de acilos.

Puede construirse un vector o vectores de expresión para albergar uno o más ácidos nucleicos que codifican la ruta de FAS independiente de malonil-CoA y/o de reducción de acilos unidos operativamente a secuencias de control de expresión funcionales en el organismo huésped. Los vectores de expresión aplicables para su uso en los organismos huésped microbianos de la divulgación incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores de fago, vectores virales y cromosomas artificiales. También pueden incluirse genes marcadores seleccionables que, por ejemplo, proporcionan resistencia a antibióticos o toxinas, deficiencias auxotróficas de complemento, o suplir nutrientes críticos no en los medios de cultivo. Las secuencias de control de 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 dos o más ácidos nucleicos exógenos codificantes van a coexpresarse, pueden insertarse ambos ácidos nucleicos, por ejemplo, en un único vector de expresión o en vectores de expresión separados. Para la expresión de único vector, los ácidos nucleicos codificantes pueden unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión común o unirse a diferentes secuencias de control de la expresión, tales como un promotor inducible y un promotor constitutivo. La transformación de secuencias de ADN exógeno implicada en una ruta metabólica o sintética se confirmará usando métodos bien conocidos en la técnica.

La producción de alcohol primario puede detectarse y/o monitorizarse usando métodos bien conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede analizarse el producto final de alcohol primario y/o productos intermedios tales como acil-CoA y ácidos orgánicos mediante HPLC, CG-EM y CL-EM. Por ejemplo, pueden separarse alcoholes primarios 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 de UV a 215 nm (Hennessy *et al.* 2004, J. Forensic Sci. 46(6):1-9). La liberación o secreción de alcohol primario en el medio de cultivo o caldo de fermentación también puede detectarse usando estos procedimientos. Las actividades de una o más enzimas en la ruta de reducción de acilos y/o FAS independiente de malonil-CoA también pueden medirse usando métodos bien conocidos en la técnica.

Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación se construyen usando métodos bien conocidos en la técnica tal como se ejemplificó anteriormente para expresar de manera exógena al menos un ácido nucleico que codifica una enzima de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA en cantidades suficientes para producir alcohol primario. Siguiendo las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación pueden lograr biosíntesis mayor de la que puede sintetizarse en organismos que se producen de manera natural. Generalmente, la concentración intracelular de, por ejemplo, octanol es de aproximadamente 54 µg/l y de decanol es de aproximadamente 148 µg/l.

Tal como se describe a continuación adicionalmente, una condición de crecimiento a modo de ejemplo para lograr biosíntesis de alcoholes primarios incluye condiciones de fermentación o cultivo anaerobio. En determinadas divulgaciones los organismos microbianos que no se producen de manera natural pueden mantenerse, cultivarse o fermentarse en condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias. Brevemente, condiciones anaerobias se

refiere a un medio carente de oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaerobias incluyen, por ejemplo, un cultivo, fermentación discontinua o fermentación continua de modo que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanece entre el 0 y el 10 % de saturación. Las condiciones sustancialmente anaerobias también incluyen células en crecimiento o reposo en medio líquido o sobre agar sólido dentro de una cámara sellada mantenida con una atmósfera de menos del 1 % de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede mantenerse, por ejemplo, burbujeando el cultivo con una mezcla de N_2/CO_2 u otro gas o gases adecuados distintos de oxígeno.

La divulgación proporciona además un método para la producción de alcoholes primarios. El método incluye cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de síntesis de ácidos grasos (FAS) independiente de malonil-CoA y una ruta de reducción de acilos que comprende al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA expresado en cantidades suficientes para producir un alcohol primario en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir dicho alcohol primario, dicha ruta de FAS independiente de malonil-CoA que comprende cetoacil-CoA aciltransferasa o cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa, dicha ruta de reducción de acilos que comprende una acil-CoA reductasa y una alcohol deshidrogenasa.

Cualquiera de los organismos microbianos que no se producen de manera natural descritos previamente puede cultivarse para producir los productos biosintéticos de la divulgación. Por ejemplo, los productores de alcohol primario pueden cultivarse para la producción biosintética de su alcohol primario objetivo modificado por ingeniería genética. El alcohol primario puede aislarse o asilarse y utilizarse adicionalmente en una amplia variedad de productos y procedimientos.

En algunas divulgaciones las condiciones de cultivo incluyen condiciones de crecimiento o mantenimiento anaerobias o sustancialmente anaerobias. Se han descrito previamente condiciones anaerobias a modo de ejemplo y se conocen bien en la técnica. A continuación se describen condiciones anaerobias a modo de ejemplo para procesos de fermentación y se conocen bien en la técnica. 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.

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 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. Los procedimientos de crecimiento a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, fermentación semicontinua y separación discontinua; fermentación semicontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Todos estos procesos se conocen bien en la técnica.

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

En la técnica se conocen bien procedimientos de fermentación. Brevemente, la fermentación para la producción biosintética de productos de alcohol primario de la divulgación puede utilizarse en, por ejemplo, fermentación semicontinua y separación discontinua; fermentación semicontinua y separación continua, o fermentación continua y separación continua. Ejemplos de procedimiento de fermentación discontinua y continua bien conocidos en la técnica se ejemplifican además a continuación en los ejemplos.

En una divulgación adicional, los organismos microbianos que producen alcohol primario utilizan materias primas renovables y gas que contiene carbono como fuentes de carbono para el crecimiento. Emplear estos materiales alternativos como materia prima es particularmente útil porque son beneficiosos desde un punto de vista medioambiental y reducen los costes de producción de productos derivados del proceso biológico tales como los alcoholes primarios de la divulgación.

Las materias primas renovables útiles para el crecimiento de los organismos que producen alcohol primario de la divulgación, incluyendo procesos de fermentación con los organismos modificados de la divulgación, pueden incluir cualquier materia prima regenerativa que puede usarse por la célula como suministro de carbono u otra fuente de energía. En general, las materias primas renovables derivan de organismos vivos o sus subproductos metabólicos incluyendo material derivado de biomasa, que consiste a menudo en componentes infrautilizados como paja. Los productos agrícolas cultivados específicamente para su uso como materias primas renovables y útiles en los métodos de la divulgación incluyen, por ejemplo, maíz, soja y algodón; lino y colza; azúcar de caña y aceite de

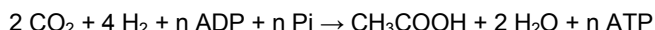
palma. Las materias primas renovables que pueden usarse, por tanto, incluyen una serie de hidratos de carbono, grasas y proteínas derivados de materia agrícola y/o animal que puede aprovecharse por los organismos que producen alcohol primario de la divulgación como una fuente para carbono.

- 5 La biomasa derivada de plantas que está disponible como fuente de energía de forma sostenible incluye, por ejemplo, cosechas energéticas herbáceas o de madera, cosechas alimenticias y de alimentos agrícolas, desechos y residuos de cosechas agrícolas, desechos y residuos de madera, plantas acuáticas, y otros materiales de desecho incluyendo algunos desechos municipales (véase, por ejemplo, la URL
- 10 1.eere.energy.gov/biomass/information_resources.html, que incluye una base de datos que describe más de 150 tipos a modo de ejemplo de fuentes de biomasa). Los tipos de biomasa a modo de ejemplo que pueden usarse como materias primas en los métodos de la divulgación incluyen biomasa celulósica, biomasa hemicelulósica y materias primas de lignina o porciones de materias primas. Tales materias primas de biomasa contienen, por ejemplo, sustratos de hidratos de carbono útiles como fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fructosa y almidón. Dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los
- 15 expertos en la técnica entenderán que también pueden usarse materias primas renovables y biomasa distintas de las ejemplificadas anteriormente para cultivar los organismos microbianos de la divulgación para la producción de una amplia variedad de alcoholes primarios.

- Además de materias primas renovables tales como las ejemplificadas anteriormente, los organismos microbianos que producen alcohol primario de la divulgación también pueden modificarse para crecimiento sobre gas sintético como su fuente de carbono. En esta divulgación específica se expresan una o más proteínas o enzimas en los organismos que producen alcohol primario para proporcionar una ruta metabólica para la utilización de gas sintético u otra fuente de carbono gaseoso.
- 20

- 25 El gas de síntesis, también conocido como gas sintético o gas productor, es el producto de gasificación principal de carbón y de materiales carbonosos tales como materiales de biomasa, incluyendo residuos y cosechas agrícolas. El gas sintético 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 carbón, gas natural, biomasa y materia orgánica residual. La gasificación se lleva a cabo generalmente con una razón alta de combustible con respecto a
- 30 oxígeno. Aunque en gran medida H₂ y CO, el gas sintético también puede incluir CO₂ y otros gases en cantidades más pequeñas. Por tanto, el gas de síntesis proporciona una fuente rentable de carbono gaseoso tal como CO y, además, 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 utilizar CO y gas sintético también tienen generalmente la capacidad de utilizar CO₂ y mezclas de CO₂/H₂ mediante el mismo conjunto básico de enzimas y transformaciones abarcadas por la ruta de Wood-Ljungdahl. La conversión de CO₂ dependiente de H₂ en acetato mediante microorganismos fue reconocida mucho antes de que se revelara que también podía usarse CO por los mismos organismos y que estaban implicadas las mismas. Muchos acetógenos han demostrado crecer en presencia de CO₂ y producir compuestos tales como
- 40 acetato siempre que esté presente hidrógeno para suministrar los equivalentes de reducción necesarios (véase por ejemplo, Drake, Acetogenesis, págs. 3-60 Chapman y Hall, Nueva York, (1994)). Esto puede resumirse mediante la siguiente ecuación:



- 45 Por tanto, microorganismos que no se producen de manera natural que presentan la ruta de Wood-Ljungdahl pueden utilizar mezclas de CO₂ y H₂ así como 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 sintético 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 mediante las siguientes enzimas: ferredoxina oxidoreductasa, formiato deshidrogenasa, formiltetrahidrofolato sintetasa, meteniltetrahidrofolato ciclodehidratasa, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa y metilentetrahidrofolato reductasa. Las reacciones en la rama de carbonilo se catalizan en orden
- 55 mediante las siguientes enzimas: proteína corrinoide/sulfuro de hierro de cobalamida, metiltransferasa, monóxido de carbono deshidrogenasa, acetil-CoA sintasa, acetil-CoA sintasa disulfuro reductasa e hidrogenasa. Siguiendo las enseñanzas y guía proporcionadas anteriormente para introducir un número suficiente de ácidos nucleicos codificantes para completar o bien la ruta de FAS independiente de malonil-CoA y/o la ruta de reducción de acilos, o bien ambas, los expertos en la técnica entenderán que también puede realizarse el mismo diseño de ingeniería genética con respecto a introducir al menos los ácidos nucleicos que codifican las enzimas 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 divulgación de modo que el organismo modificado contiene la ruta de Wood-Ljungdahl completa conferirá capacidad de utilización de gas sintético.
- 60

- La divulgación también se refiere, en parte, al diseño y la creación de células y organismos que tienen producción acoplada al crecimiento de LCA. La divulgación utiliza enfoques basados en optimización basados en modelo
- 65

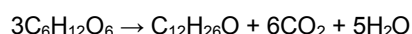
estequiométrico *in silico* de metabolismo de *Escherichia coli* que identifican diseños metabólicos para producción óptima de LCA. Un marco de trabajo de programación de dos niveles, OptKnock, se aplica dentro de un algoritmo iterativo para predecir múltiples conjuntos de alteraciones génicas, que dan como resultado colectivamente la producción acoplada al crecimiento de LCA. Los resultados descritos en el presente documento indican que combinaciones de delecciones génicas estratégicamente ubicadas o alteraciones funcionales de genes mejoran significativamente las capacidades de producción de LCA de *Escherichia coli* y otras células u organismos. Las estrategias de diseño de capa son igualmente aplicables si un organismo distinto de *E. coli* se elige como huésped de producción, incluso si el organismo carece de manera natural de la actividad o presenta baja actividad de un subconjunto de los productos génicos marcados para alteración. En esos casos, las alteraciones solo deben introducirse para eliminar o disminuir las actividades enzimáticas de los productos génicos que están presentes de manera natural en el huésped de producción elegido. La producción acoplada al crecimiento de LCA para los diseños *in silico* se confirman mediante construcción de cepas que tienen el genotipo metabólico diseñado.

Estas células u organismos modificados por ingeniería genética metabólicamente también pueden someterse a evolución adaptativa para aumentar adicionalmente la producción de producto acoplada a crecimiento.

La divulgación también se refiere, en parte, al diseño y creación de células y organismos que producen alcoholes de cadena larga, LCA basados en el modelo estequiométrico *in silico* de metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. Un experto en la técnica reconocerá la capacidad de producir también LCA mediante producción no acoplada al crecimiento proporcionando una fase no productora de crecimiento, seguido por una fase de no producción de crecimiento, por ejemplo. Los resultados descritos en el presente documento indican que combinaciones de delecciones génicas o alteraciones funcionales de genes mejoran significativamente las capacidades de producción de LCA de *Saccharomyces cerevisiae* y otras células de organismos eucariotas y organismos eucariotas microbianos. Las rutas de diseño de cepa se aplican igualmente si un organismo eucariota microbiano distinto de *S. cerevisiae* se elige como huésped de producción, incluso si el organismo carece de manera natural de la actividad o presenta baja actividad de un subconjunto de los productos génicos marcados para alteración. En el último caso, pueden introducirse alteraciones para eliminar o disminuir las actividades enzimáticas de los productos génicos que están presentes de manera natural en el huésped de producción elegido. En algunas divulgaciones, se confirma la producción acoplada al crecimiento de LCA para las rutas metabólicas determinadas *in silico* mediante construcción de cepas que tienen el genotipo metabólico diseñado. Estas células u organismos modificados por ingeniería genética metabólicamente también pueden someterse a evolución adaptativa para aumentar adicionalmente la producción de producto acoplada a crecimiento. En algunas divulgaciones las células u organismos modificados por ingeniería genética también pueden incorporar copias adicionales de genes beneficiosos para aumentar el flujo a través de una ruta metabólica particular. Alternativamente, pueden usarse inserciones de genes exógenos de otro organismo para instalar funcionalidad que no está presente en el organismo huésped.

En algunas divulgaciones la ruta de producción de LCA diseñada utiliza una ruta de síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA acoplada con reducción del ácido graso para formar alcohol primario tal como se muestra en la figura 1. La ruta de producción de LCA independiente de malonil-CoA (ruta de MI-LCA) comprende las etapas de síntesis de ácidos grasos independiente de malonil-CoA y las etapas de reducción de acil-CoA. Un microorganismo modificado por ingeniería genética que presenta la ruta de MI-LCA convertirá materias primas renovables de bajo coste, tales como glucosa y sacarosa, en acetil-CoA a través de glicólisis. Entonces se usa acetil-CoA tanto como cebador como unidades de extensión en un ciclo de elongación que implica la cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa. Al final de cada ciclo de elongación, se forma una acil-CoA que es una unidad C₂ mayor que la acil-CoA que entra en el ciclo de elongación. La acil-CoA con una longitud de cadena deseada se reduce entonces mediante la combinación de acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa o el alcohol graso que forma acil-CoA reductasa para formar el alcohol primario deseado. La longitud de la cadena de carbono del LCA puede controlarse mediante enoil-CoA reductasa, cetoacil-CoA tiolasa y/o acil-CoA reductasa específicas de longitud de cadena.

La ruta de MI-LCA tiene la ventaja de mejor producto y rendimientos de ATP que a través de las rutas típicas de síntesis de ácidos grasos de energía intensiva para la producción de LCA. Por ejemplo, el rendimiento teórico máximo para dodecanol (C₁₂) usando la ruta de MI-LCA es de 0,333 mol por mol de glucosa consumido en condiciones tanto aerobias como anaerobias:



Además, las características de energía y rédox de la ruta de MI-LCA la hacen adecuada para la creación de cepas que acoplan la producción de LCA al crecimiento usando algoritmos OptKnock (Burgard, A.P., P. Pharkya, y C.D. Maranas, OptKnock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 84(6): p. 647-57; Pharkya, P., A.P. Burgard, y C.D. Maranas, Exploring the overproduction of aminoacids using the bilevel optimization framework OptKnock. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 84(7): p. 887-99; Pharkya, P., A.P. Burgard, y C.D. Maranas, OptStrain: a computational framework for redesign of microbial production systems. *Genome Res*, 2004, 14(11):p.2367-76.). Las cepas de producción acopladas al crecimiento resultantes serán inherentemente estables, de autooptimización, y adecuadas para diseños de procesos discontinuos, semicontinuos y continuos.

Algunas divulgaciones se refieren a una plataforma de ingeniería genética e informática integrada para desarrollar cepas de microorganismos metabólicamente alterados que tienen características de producción de LCA potenciadas. Las cepas identificadas por medio del componente informático de la plataforma se ponen en producción real modificando por ingeniería genética las alteraciones metabólicas predichas que conducen a la producción de LCA potenciada. La producción del producto deseado se acopla a crecimiento óptimo del microorganismo para optimizar rendimientos de este producto durante la fermentación. En aún otra divulgación, las cepas que presentan producción acoplada al crecimiento de LCA se someten adicionalmente a evolución adaptativa para aumentar adicionalmente la biosíntesis de producto. Los niveles de producción de producto acoplada a crecimiento tras evolución adaptativa también pueden predecirse mediante el componente informático del sistema, en el que los niveles de producto elevados se realizan solo tras evolución.

La divulgación proporciona un organismo microbiano que no se produce de manera natural, que incluye una o más alteraciones génicas. Las alteraciones se producen en genes que codifican una enzima que acopla la producción de LCA al crecimiento del organismo cuando la alteración génica reduce la actividad de la enzima, de modo que las alteraciones génicas confieren producción estable acoplada al crecimiento de LCA al organismo que no se produce de manera natural.

La divulgación proporciona además un organismo eucariota que no se produce de manera natural, que incluye una o más alteraciones génicas. La una o más alteraciones génicas se producen en genes que codifican enzimas que incluyen, por ejemplo una piruvato descarboxilasa citosólica, una piruvato deshidrogenasa mitocondrial, una alcohol deshidrogenasa específica de etanol citosólica o una alcohol deshidrogenasa específica de etanol mitocondrial. Estas alteraciones génicas confieren producción de alcoholes de cadena larga en el citosol o la mitocondria (véase a continuación) del organismo.

Además, la presente divulgación proporciona métodos de producción de tales organismos microbianos no naturales que tienen producción estable acoplada al crecimiento de LCA. Para la producción de LCA, por ejemplo, el método incluye: (a) identificar *in silico* un conjunto de modificaciones metabólicas que requieren producción de LCA durante el crecimiento celular, y (b) modificar genéticamente un microorganismo para que contenga el conjunto de modificaciones metabólicas que requieren producción de LCA.

Una consideración para el bioprocesamiento es si usar un esquema de fermentación discontinua o continua. Una diferencia entre los dos esquemas que influirá en la cantidad de producto producido es la presencia de una fase de preparación, retardo y estacionaria para el esquema discontinuo además de la fase de crecimiento exponencial. En cambio, se mantienen procesos continuos en un estado de crecimiento exponencial constante y, si se operan adecuadamente, pueden ejecutarse durante muchos meses cada vez. Para la formación de producto asociada con el crecimiento y asociada con el crecimiento mixta, los procesos continuos proporcionan productividades mucho mayores (es decir, tasa de dilución por masa celular) debido a la eliminación de las fases de preparación, retardo y estacionaria. Por ejemplo, dadas las siguientes presunciones razonables:

Cinética Monod (es decir, $\mu = \mu_m \cdot S / (K_s + S)$)

$$\mu_m = 1,0 \text{ h}^{-1}$$

concentración celular final/concentración celular inicial = 20

$$t_{\text{prep}} + t_{\text{retardo}} + t_{\text{est.}} = 5 \text{ h}$$

concentración de alimentación de nutriente limitante $\gg K_s$

se ha estimado productividad aumentada a partir de un proceso continuo en 8 veces, Shuler *et al*, Prentice Hall, Inc.: Upper Saddle River, NJ., 245-247.

A pesar de las ventajas en la productividad, muchos más procesos discontinuos están en operación que procesos continuos por varios motivos. En primer lugar, para la formación de producto no asociada a crecimiento (por ejemplo, penicilina), la productividad de un sistema discontinuo puede superar significativamente la de un proceso continuo porque el último tendría que operar a tasas de dilución muy bajas. A continuación, las cepas de producción se han sometido generalmente a modificaciones en su material genético para mejorar sus capacidades bioquímicas o de producción de proteína. Estas cepas especializadas es probable que crezcan menos rápidamente que sus complementos parentales mientras que procesos continuos tales como los que emplean quimiostatos (fermentadores operados en modo continuo) imponen grandes presiones de selección para las células en crecimiento más rápidas. Las células que contienen ADN recombinante o que portan mutaciones puntuales que conducen al fenotipo de sobreproducción deseado son susceptibles a mutación inversa en la cepa parental menos productiva original. También es posible que las cepas que tienen delecciones génicas individuales desarrollen mutaciones compensatorias que tenderán a restablecer el fenotipo de crecimiento de tipo natural. Las células que crecen más rápido habitualmente dejan fuera sus contrapartidas más productivas para limitar nutrientes, reduciendo

dramáticamente la productividad. Por otro lado, los procesos discontinuos limitan el número de generaciones disponibles no reutilizando células al final de cada ciclo, reduciendo por tanto la probabilidad de que la cepa de producción vuelva a su fenotipo de tipo natural. Finalmente, los procesos continuos son más difíciles de operar a largo plazo debido a posibles obstáculos de ingeniería genética tales como fallo del equipo y contaminación por organismo extraño. Las consecuencias de tales fallos son también mucho más considerables para un proceso continuo que con un cultivo discontinuo.

Para producción de pequeño volumen de productos químicos de especialidad y/o proteínas, los aumentos de productividad de procesos continuos rara vez compensan los riesgos asociados con estabilidad y fiabilidad de la cepa. Sin embargo, para la producción de productos de gran volumen, asociados al crecimiento tales como LCA, el aumento en productividad para un proceso continuo puede dar como resultado ganancias económicas significativas en comparación con un proceso discontinuo. Aunque los obstáculos de ingeniería genética asociados con operación de bioprocesos continuos estarían siempre presentes, las preocupaciones sobre la estabilidad de la cepa pueden superarse mediante estrategias de modificación por ingeniería genética metabólicas que vuelven a encauzar rutas metabólicas para reducir o evitar presiones selectivas negativas y favorecer la producción del producto objetivo durante la fase de crecimiento exponencial.

Un método informático para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la producción acoplada al crecimiento de un producto es el marco de trabajo informático OptKnock, Burgard *et al.*, Biotechnol Bioeng, 84: 647-57 (2003). OptKnock es un programa de modelación y simulación metabólica que sugiere estrategias génicas de alteración que dan como resultado microorganismos genéticamente estables que sobreproducen el producto objetivo. Específicamente, el marco de trabajo examina la red metabólica y/o bioquímica completa de un microorganismo con el fin de sugerir manipulaciones genéticas que fuerzan al producto bioquímico deseado a volverse un subproducto de 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 modificadas por ingeniería genética tras largos periodos de tiempo en un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción bioquímica acoplada a crecimiento obligatoria.

El concepto de producción bioquímica acoplada a crecimiento puede visualizarse en el contexto de las envolturas de producción bioquímica de una red metabólica típica calculada usando un modelo *in silico*. Estos límites se obtienen fijando la(s) tasa(s) de captación del/de los sustrato(s) limitante(s) a su(s) valor(es) medido(s) experimentalmente y calculando las tasas de producción bioquímica máximas y mínimas en cada nivel de crecimiento obtenible. Aunque existen excepciones, normalmente la producción de un producto bioquímico deseado está en competición directa con la formación de biomasa para recursos intracelulares. Por tanto, tasas potenciadas de producción bioquímica darán necesariamente como resultado tasas de crecimiento submáximas. Las alteraciones sugeridas por OptKnock están diseñadas para restringir los límites de disolución permisibles que fuerzan un cambio en el comportamiento metabólico de la cepa de tipo natural tal como se representa en la figura 2. Aunque los límites de disolución reales para una cepa dada se expandirán o contraerán según aumente(n) o disminuya(n) la(s) tasa(s) de captación de sustrato, cada punto experimental debe situarse dentro de su límite de disolución calculado. Gráficos tales como estos permiten visualizar cuán próximas estás las cepas a sus límites de rendimiento o, en otras palabras, cuánto puede mejorarse. La marco de trabajo OptKnock ya ha sido capaz de identificar estrategias génicas de alteración prometedoras para sobreproducción bioquímica, (Burgard, A.P., P. Pharkya, y C.D. Maranas, Biotechnol Bioeng, 84(6):647-657 (2003); Pharkya, P., A.P. Burgard, y C.D. Maranas, Biotechnol Bioeng, 84(7):887-899 (2003)) y establece un marco de trabajo sistemático que abarcará naturalmente futuras mejoras en marcos de trabajo de modelación reguladores y metabólicos.

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 van a retirarse completamente del genoma.

Brevemente, OptKnock es un término usado en el presente documento para referirse a un método informático y sistema para modelar metabolismo celular. El programa OptKnock se refiere a un marco de trabajo de modelos y métodos que incorporan restricciones particulares a los modelos de análisis de balance de flujo (FBA). Estas restricciones incluyen, por ejemplo, información cinética cualitativa, información reguladora cualitativa y/o datos experimentales de microalineamientos de ADN. OptKnock también computa disoluciones con diversos problemas metabólicos, por ejemplo, ajustando los límites de flujo derivados de modelos de balance de flujo y sondando posteriormente los límites de rendimiento de redes metabólicas en presencia de adiciones o alteraciones génicas. El marco de trabajo informático OptKnock permite la construcción de formulaciones modelo que permiten una consulta eficaz de los límites de rendimiento de redes metabólicas y proporciona métodos para resolver los problemas de programación lineales de número entero mixtos resultantes. Los métodos de modelación y simulación metabólicos a los que se hace referencia en el presente documento como OptKnock se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/043.440, presentada el 10 de enero de 2002, y en la patente internacional n.º PCT/US02/00660, presentada el 10 de enero de 2002.

Otro método informático para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la producción acoplada al

crecimiento de un producto es el sistema de modelación y simulación metabólico denominado SimPheny®. Este método y sistema informático se describe en, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/173.547, presentada el 14 de junio de 2002, y en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US03/18838, presentada el 13 de junio de 2003.

SimPheny® es un sistema informático 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 contiene cualquiera y todas 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 a veces modelado basado en restricciones debido a que el espacio de solución está definido por restricciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas así como termodinámica de la reacción y restricciones de capacidad asociadas con flujos máximos a través de las reacciones. El espacio definido por estas restricciones puede interrogarse para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos. Métodos de análisis tales como análisis convexo, programación lineal y el cálculo de rutas de extremo tal como se describen, por ejemplo, en Schilling *et al.*, J. Theor. Biol. 203:229-248 (2000); Schilling *et al.*, Biotech. Bioeng. 71:286-306 (2000) y Schilling *et al.*, Biotech. Prog. 15:288-295 (1999), pueden usarse para determinar tales capacidades fenotípicas.

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

Una vez se ha definido el espacio de solución, puede analizarse para determinar posibles soluciones en diversas condiciones. Este enfoque informático es coherente con las 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 han sido restringidos por restricciones fundamentales que todos los sistemas vivos deben enfrentar. Por tanto, la estrategia de modelado basada en restricciones abarca estas realidades generales. Además, la capacidad de imponer continuamente restricciones adicionales en un modelo de red mediante el ajuste de las restricciones da como resultado una reducción en el tamaño del espacio de la solución, mejorando así la precisión con la que puede predecirse el rendimiento fisiológico o el fenotipo.

Dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica serán capaces de aplicar diversos marcos de trabajo informáticos para la simulación y modelado metabólico para diseñar e implementar la producción acoplada al crecimiento de un producto bioquímico. Tales métodos de modelado y simulación metabólicos incluyen, por ejemplo, los sistemas informáticos ejemplificados anteriormente como SimPheny® y OptKnock. Para simplicidad de la ilustración de la divulgación, los métodos y cepas se describirán en el presente documento con referencia al marco de trabajo informático OptKnock para modelar y simular. Los expertos en la técnica conocerán cómo aplicar la identificación, diseño e implementación de las alteraciones metabólicas usando OptKnock a cualquiera de otras regiones de trabajo de modelado y simulación metabólicas y métodos bien conocidos en la técnica.

La capacidad de una célula u organismo para acoplar crecimiento a la producción de un producto bioquímico puede ilustrarse en el contexto de los límites de producción bioquímica de una red metabólica típica calculados usando un modelo *in silico*. Estos límites se obtienen fijando la(s) tasa(s) de captación del/de los sustrato(s) limitante(s) a su(s) valor(es) medido(s) experimentalmente y calculando las tasas de producción bioquímica máximas y mínimas en cada nivel de crecimiento obtenible. Tal como se muestra en la figura 2, la producción de un producto bioquímico deseado generalmente está en competición directa con la formación de biomasa para recursos intracelulares. En estas circunstancias, tasas potenciadas de producción bioquímica darán necesariamente como resultado tasas de crecimiento submáximas. Las alteraciones sugeridas por los programas de modelado y simulación metabólicos anteriores tales como OptKnock están diseñadas para restringir los límites de solución permisibles que fuerzan un cambio en el comportamiento metabólico de la cepa de tipo natural tal como se representa en la figura 2. Aunque los límites de solución reales para una cepa dada se expandirán o contraerán según aumente(n) o disminuya(n) la(s) tasa(s) de captación de sustrato, cada punto experimental se situará dentro de su límite de solución calculado. Gráficos tales como aquellos que permiten predicciones fiables de cuán próximas están las cepas diseñadas a sus límites de rendimiento lo que también indica cuánto puede mejorarse.

El marco de trabajo matemático de OptKnock se ejemplifica en el presente documento para señalar alteraciones

génicas que conduce a producción bioquímica acoplada a crecimiento tal como se ilustra en la figura 2. El procedimiento se basa en un modelado metabolito basado en restricción que estrecha el intervalo de posibles fenotipos que un sistema celular puede presentar a través de la imposición sucesiva de restricciones fisicoquímicas reinantes, Price *et al.*, Nat Rev Microbiol, 2: 886-97 (2004). Tal como se describió anteriormente, los modelos y simulaciones basados en restricciones se conocen bien en la técnica y generalmente invocan la optimización de un objetivo celular particular, sujeto a estequiometría de red, para sugerir una distribución de flujo probable.

Brevemente, la maximización de un objetivo celular cuantificado como flujo de reacción de agregados para una red de trabajo metabólica en estado estable que comprende un conjunto $N = \{1, \dots, N\}$ de metabolitos y un conjunto $M = \{1, \dots, M\}$ de reacciones metabólicas se expresa matemáticamente tal como sigue:

$$\begin{aligned} &\text{maximizar} && v_{\text{objetivo celular}} \\ &\text{someter a} && \sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0, && \forall i \in N \\ &&& v_{\text{sustrato}} = v_{\text{sustrato_captación}} \text{ mmol/gDW}\cdot h && \forall i \in \{\text{sustrato(s) limitante(s)}\} \\ &&& v_{\text{atp}} \geq v_{\text{atp_mant.}} \text{ mmol/gDW}\cdot h \\ &&& v_j \geq 0, && \forall j \in \{\text{reacciones irrev.}\} \end{aligned}$$

donde S_{ij} es el coeficiente estequiométrico de metabolito i en reacción j , v_j es el flujo de reacción j , $v_{\text{sustrato_captación}}$ representa la(s) tasa(s) asumida(s) o medida(s) de captación del/de los sustrato(s) limitante(s), y $v_{\text{atp_mant.}}$ es el requisito de mantenimiento de ATP no asociado con crecimiento. El vector v incluye tanto flujos internos como externos. En este estudio, a menudo se supone que el objetivo celular es un drenaje de precursores biosintéticos en las proporciones requeridas para la formación de biomasa, Neidhardt, F.C. *et al.*, 2.^a ed. 1996, Washington, D.C.: ASM Press. 2 v. (xx, 2822, lxxvi). Los flujos se comunican generalmente por 1 gDW·h (gramo de peso seco por hora) de modo que la formación de biomasa se expresa como g *biomasa producida*/gDW·h o 1/h.

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

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

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

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

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

Las alteraciones génicas/reacciones óptimas se identifican resolviendo un problema de optimización de dos niveles que elige el conjunto de reacciones activas ($y_j = 1$) de modo que una solución de crecimiento óptima para la red de trabajo resultante produzca en exceso el producto químico de interés. Esquemáticamente, este problema de optimización de dos niveles se ilustra en la figura 2. Matemáticamente, este problema de optimización de dos niveles se expresa como el siguiente problema de optimización de enteros mixtos de dos niveles:

$$\begin{array}{ll}
 \text{maximizar} & v_{químico} \\
 & y_j
 \end{array} \quad \text{(OptKnock)}$$

$$\left(\begin{array}{ll}
 \text{someter a} & \text{maximizar} \quad v_{biomasa} \\
 & \bar{v}_j \\
 & \text{someter a} \quad \sum_{j=1}^M S_{ij} v_j = 0, \quad \forall i \in N \\
 & v_{sustrato} = v_{sustrato_captación} \quad \forall i \in \{\text{sustrato(s) limitante(s)}\} \\
 & v_{atp} \geq v_{atp_mant.} \\
 & v_{biomasa} \geq v_{biomasa}^{diana} \\
 & v_j^{\min} \cdot y_j \leq v_j \leq v_j^{\max} \cdot y_j, \quad \forall j \in M \\
 & \sum_{j \in M} (1 - y_j) = K \\
 & y_j \in \{0,1\}, \quad \forall j \in M
 \end{array} \right)$$

donde $v_{químico}$ es la producción del producto objetivo deseado, por ejemplo LCA u otro producto bioquímico, y K es el número de inactivaciones permisibles. Obsérvese que establecer K igual a cero hace que la solución de biomasa máxima de la red de trabajo sea completa, mientras establecer K igual a uno identifica la inactivación de gen único/reacción ($y_j = 0$) de modo que la red de trabajo resultante implica la sobreproducción máxima dado su rendimiento de biomasa máximo. La restricción final garantiza que la red de trabajo resultante cumple con un rendimiento de biomasa mínimo. Burgard *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 84: 647-57 (2003), proporcionan una descripción más detallada de la formulación modelo y procedimiento de solución. Pueden resolverse problemas que contienen cientos de variables binarias en el orden de minutos a horas usando CPLEX 8.0, *GAMS: The Solver Manuals*. 2003: GAMS Development Corporation, registrado por medio de GAMS, Brooke *et al.*, GAMS Development Corporation (1998), entorno de modelado en una estación de trabajo IBM RS6000-270. El marco de trabajo OptKnock ya ha sido capaz de identificar estrategias génicas de alteración prometedoras para sobreproducción bioquímica, Burgard *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 84: 647-57 (2003), Pharkya *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 84: 887-899 (2003), y establece un marco de trabajo sistemático que abarcará naturalmente futuras mejoras en marcos de trabajo metabólicos y de modelación reguladores.

Cualquier solución del problema OptKnock de dos niveles descrito anteriormente proporcionará un conjunto de reacciones metabólicas a alterar. La eliminación de cada reacción dentro del conjunto o la modificación metabólica dar como resultado LCA como producto durante la fase de crecimiento del organismo. Debido a que las reacciones son conocidas, una solución al problema OptKnock de dos niveles también proporcionará el gen asociado o los genes que codifican 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 las enzimas que participan en cada reacción es generalmente un proceso automatizado, que se realiza a través de la correlación de las reacciones con una base de datos de reacciones que tiene una relación entre las enzimas y los genes codificantes.

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que van a alterarse para lograr la producción de LCA acoplada al crecimiento se implementa en la célula u organismo objetivo mediante la alteración funcional de al menos un gen que codifica cada reacción metabólica dentro del conjunto. Tal como se describió anteriormente, un medio particularmente útil para lograr la alteración funcional del conjunto de reacción es mediante la delección de cada gen codificante. Sin embargo, en algunos casos, puede ser beneficioso alterar la reacción mediante otras aberraciones genéticas que incluyen, por ejemplo, mutación, delección de regiones reguladoras como promotores o sitios de unión *cis* para factores reguladores, o mediante truncamiento de la secuencia codificante en cualquiera de varias ubicaciones. Estas últimas aberraciones, que dan como resultado menos de la delección total del conjunto de genes, pueden ser útiles, por ejemplo, cuando se desean evaluaciones rápidas del acoplamiento del producto o cuando es menos probable que ocurra una reversión genética.

Para identificar soluciones productivas adicionales al problema OptKnock de dos niveles descrito anteriormente que conducen a conjuntos adicionales de reacciones para alterar o modificaciones metabólicas que pueden dar como resultado la producción de LCA acoplada al crecimiento, u otros productos bioquímicos, puede implementarse un método de optimización, denominado cortes enteros. Este método procede mediante la resolución iterativa del problema OptKnock ejemplificado anteriormente con la incorporación de una restricción adicional conocida como un corte entero en cada iteración. Las restricciones de corte de número entero impiden de manera eficaz que el procedimiento de solución elija exactamente el mismo conjunto de reacciones identificadas en cualquier iteración anterior que une la biosíntesis del producto al crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica acoplada al crecimiento previamente identificada especifica las reacciones 1, 2 y 3 para la alteración, entonces la siguiente restricción impide que las mismas reacciones se consideren simultáneamente en las disoluciones siguientes: $y_1 + y_2 + y_3 \geq 1$. El método de corte de números enteros se conoce bien en la técnica y puede encontrarse descrito

en, por ejemplo, referencia, Burgard *et al.*, Biotechnol Prog, 17: 791-797 (2001).). Al igual que con todos los métodos descritos en el presente documento con referencia a su uso en combinación con el marco de trabajo informático OptKnock para el modelado y simulación metabólica, el método de corte de números enteros para reducir la redundancia en el análisis informático iterativo también puede aplicarse a otros marcos de trabajo informáticos bien conocidos en la técnica, incluidos por ejemplo, SimPheny.

Las restricciones de la forma anterior impiden la identificación de conjuntos de reacción más grandes que incluyen conjuntos previamente identificados. Por ejemplo, emplear el método de optimización de corte de número entero anterior en una iteración adicional excluiría la identificación de un conjunto de reacción cuádruple que especificaba las reacciones 1, 2 y 3 para la alteración, puesto que estas reacciones se habían identificado previamente. Para asegurar la identificación de todos los conjuntos de reacciones posibles que conducen a la producción acoplada al crecimiento de un producto, se empleó una modificación del método de corte de números enteros.

Brevemente, el procedimiento de corte de número entero modificado comienza con la iteración “cero”, que calcula la producción máxima del producto bioquímico deseado en un crecimiento óptimo para una red de trabajo de tipo natural. Este cálculo corresponde a una solución OptKnock con K igual a 0. A continuación, se consideran las alteraciones individuales y los dos conjuntos de parámetros, $objstore_{iter}$ y $ystore_{iter,j}$, se introducen para almacenar la función objetivo ($v_{químico}$) e información de reacción on-off (y_j), respectivamente, en cada iteración, $iter$. Las siguientes restricciones se añaden sucesivamente a la formulación de OptKnock en cada iteración.

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

En la ecuación anterior, ε y M son números pequeños y grandes, respectivamente. En general, ε puede establecerse en aproximadamente 0,01 y M puede establecerse en aproximadamente 1000. Sin embargo, los números más pequeños y/o más grandes que estos números también pueden usarse. M asegura que la restricción puede ser vinculante solo para las estrategias de alteración identificadas previamente, mientras que ε asegura que añadir alteraciones a una estrategia previamente identificada debe conducir a un aumento de al menos ε en la producción bioquímica en un crecimiento óptimo. El enfoque avanza hacia alteraciones dobles siempre que una estrategia de alteración única no mejore la cepa de tipo natural. Luego se consideran alteraciones triples cuando no hay una estrategia de alteración doble que mejore la cepa de tipo natural, y así sucesivamente. El resultado final es una lista clasificada, representada como producción bioquímica deseada en un crecimiento óptimo, de distintas estrategias de alteración que se diferencian entre sí por al menos una alteración. Este procedimiento de optimización, así como la identificación de una amplia variedad de conjuntos de reacciones que, cuando se alteran, conducen a la producción acoplada al crecimiento de un producto bioquímico, se ilustran en detalle más adelante. Dadas las enseñanzas y la guía que se proporcionan en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que los métodos y los diseños de ingeniería metabólica ejemplificados en este documento son aplicables al acoplamiento del crecimiento de células o microorganismos a cualquier producto bioquímico.

Empleando los métodos ejemplificados anteriormente, los métodos de la divulgación permiten la construcción de células y organismos que acoplan la producción de un producto bioquímico diana al crecimiento de la célula u organismo modificado por ingeniería genética para albergar las alteraciones genéticas identificadas. En este sentido, se han identificado alteraciones metabólicas que acoplan obligatoriamente la producción al crecimiento del organismo. Cepas de organismos microbianos construidas con las alteraciones metabólicas identificadas producen niveles elevados durante la fase de crecimiento exponencial. Estas cepas pueden usarse de manera beneficiosa para la producción comercial de LCA en un proceso de fermentación continua sin someterse a las presiones selectivas negativas descritas anteriormente.

Por tanto, los métodos de la divulgación proporcionan un conjunto de modificaciones metabólicas que se identifican mediante un método *in silico* seleccionado de OptKnock. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir alteración funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, alteración mediante delección génica. Para la producción de LCA, pueden seleccionarse modificaciones metabólicas del conjunto de modificaciones metabólicas enumeradas en la tabla 1.

También se proporciona un método de producción de un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene producción de LCA acoplada al crecimiento estable. El método incluye: (a) identificar *in silico* un conjunto de modificaciones metabólicas que requieren producción de LCA durante el crecimiento exponencial; (b) modificar genéticamente un organismo para que contenga el conjunto de modificaciones metabólicas que requieren producción del producto, y cultivar el organismo modificado genéticamente. El cultivo puede incluir la evolución adaptativa del organismo modificado genéticamente en condiciones que requieren producción del producto. Los métodos de la divulgación pueden aplicarse a una bacteria, levadura y hongo así como a una variedad de otras células y microorganismos. Las bacterias a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *E. coli*, *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. Los organismos eucariotas a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* y *Pichia pastoris*.

5 Se proporciona además un organismo microbiano producido mediante los métodos de la divulgación. Adicionalmente, la divulgación proporciona un organismo microbiano que no se produce de manera natural que comprende una o más alteraciones génicas que codifican una enzima asociada con producción acoplada al crecimiento de LCA y que presenta producción acoplada al crecimiento estable de estos productos. El organismo microbiano que no se produce de manera natural de la divulgación incluye una o más alteraciones génicas que se producen en genes que codifican una enzima que acopla obligatoriamente la producción de LCA al crecimiento del organismo microbiano cuando la alteración génica reduce una actividad de la enzima, mediante lo cual las una o más alteraciones génicas confieren producción acoplada al crecimiento de LCA estable al organismo microbiano que no se produce de manera natural.

15 El organismo microbiano que no se produce de manera natural puede tener una o más alteraciones génicas incluidas en una modificación metabólica enumerada en la tabla 1. Las una o más alteraciones génicas pueden ser una delección. El organismo microbiano que no se produce de manera natural de la divulgación puede seleccionarse de un grupo de organismo microbiano que tienen una modificación metabólica enumerada en las tablas 1. Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación incluyen bacterias, levaduras, hongos o cualquiera de una variedad de otros microorganismos aplicables a procesos de fermentación. Las bacterias a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *E. coli*, *A. succiniciproducens*, *A. succinogenes*, *M. succiniciproducens*, *R. etli*, *Bacillus subtilis*, *C. glutamicum*, *G. oxydans*, *Z. mobilis*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *S. coelicolor*, *C. acetobutylicum*, *P. fluorescens* y *P. putida*. Los organismos eucariotas a modo de ejemplo incluyen especies seleccionadas de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *A. terreus*, *A. niger*, *R. arrhizus*, *R. oryzae* y *P. pastoris*.

Los organismos microbianos que tienen producción de LCA acoplada al crecimiento se ejemplifican en el presente documento con referencia a unos antecedentes genéticos de *Escherichia coli*. Sin embargo, con la secuencia genómica completa disponible para más de 550 especies actualmente (con más de la mitad de estas disponibles en bases de datos públicas tales como el NCBI), incluyendo 395 genomas de microorganismos y una variedad de genomas de levaduras, hongos, plantas y mamíferos, la identificación de un homólogo de especie alternativo para uno o más genes, incluyendo por ejemplo, desplazamientos de genes ortólogos, parálogos y no ortólogos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos es rutinario y bien conocido en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la producción acoplada al crecimiento de LCA descrita en el presente documento con referencia a un organismo particular tal como *Escherichia coli* pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos. Dadas las enseñanzas y la guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica ejemplificada en un organismo puede aplicarse igualmente a otros organismos.

40 Tal como se describió anteriormente, los homólogos pueden incluir desplazamientos de genes ortólogos y/o no ortólogos. En algunos casos, tales como cuando existe una ruta metabólica sustituta en la especie de interés, la alteración funcional puede lograrse mediante, por ejemplo, delección de un parálogo que cataliza una reacción metabólica similar, aunque no idéntica que reemplaza a la reacción a la que se hace referencia. Debido a determinadas diferencias entre redes metabólicas entre diferentes organismos, los expertos en la técnica entenderán que los genes reales alterados entre diferentes organismos pueden diferir. Sin embargo, dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica también entenderán que los métodos de la divulgación pueden aplicarse a todos los microorganismos para identificar las alteraciones metabólicas relacionadas entre organismos y construir un organismo en una especie de interés que potenciará el acoplamiento de la biosíntesis de LCA al crecimiento.

50 La divulgación se describirá en el presente documento con referencia general a la reacción metabólica, el reactante o producto de la misma, o con referencia específica a uno o más genes asociados con la reacción metabólica, reactante o producto al que se hace referencia. A menos que se establezca expresamente otra cosa en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que la referencia a una reacción también constituye una referencia a los reactantes y productos de la reacción. De manera similar, a menos que se establezca expresamente otra cosa en el presente documento, la referencia a un reactante o producto también hace referencia a la reacción y la referencia a cualquiera de estos constituyentes metabólicos también hace referencia al gen o genes que codifican las enzimas que catalizan la reacción, reactante o producto al que se hace referencia. Asimismo, dados los campos bien conocidos de bioquímica metabólica, enzimología y genómica, la referencia en el presente documento a un gen también constituye una referencia a la enzima codificada correspondiente y la reacción que cataliza así como a los reactantes y productos de la reacción. Tal como se describió anteriormente y además a continuación, se exponen reacciones, nomenclatura de reacciones, reactantes, productos, cofactores y genes que codifican enzimas que catalizan una reacción implicada en la producción acoplada al crecimiento a modo de ejemplo en las tablas 2 y 3.

65 La divulgación proporciona organismos microbianos que no se producen de manera natural que tienen producción acoplada al crecimiento de LCA. La producción de productos está vinculada obligatoriamente a la fase de

crecimiento exponencial del microorganismo alterando genéticamente las rutas metabólicas de la célula. Las alteraciones genéticas hacen que el producto deseado se produzca durante la fase de crecimiento. En la tabla 1 se ejemplifican conjuntos de alteraciones metabólicas o transformaciones que dan como resultado niveles elevados de biosíntesis, respectivamente. Cada alteración dentro de un conjunto corresponde a la reacción metabólica requerida que debe alterarse funcionalmente. La alteración funcional de todas las reacciones dentro de cada conjunto da como resultado la producción de LCA por la cepa modificada por ingeniería genética durante la fase de crecimiento. Las reacciones correspondientes a las alteraciones a las que se hace referencia y el gen o genes que codifican potencialmente las mismas en *Escherichia coli* se exponen en la tabla 2. Los diversos metabolitos, sus abreviaturas y ubicación se exponen en la tabla 3.

Por ejemplo, para cada cepa ejemplificada en la tabla 1, las alteraciones metabólicas que pueden generarse para la producción de LCA acoplada al crecimiento se muestran en cada fila. Estas alteraciones incluyen la alteración funcional de desde una hasta seis o más reacciones. En particular, se ejemplifican 995 cepas en la tabla 1 que tienen genotipos metabólicos que no se producen de manera natural. Cada una de estas alteraciones que no se producen de manera natural da como resultado un nivel potenciado de producción de LCA durante la fase de crecimiento exponencial del organismo microbiano en comparación con una cepa de tipo natural, en condiciones de cultivo apropiadas. Las condiciones apropiadas incluyen, por ejemplo, las ejemplificadas adicionalmente más adelante en el ejemplo I tal como fuentes de carbono particulares o disponibilidades de reactivos y/o evolución adaptativa.

Dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que para alterar una reacción enzimática es necesario alterar la actividad catalítica de las una o más enzimas implicadas en la reacción. La alteración puede producirse mediante una variedad de medios incluyendo, por ejemplo, delección de un gen codificante o incorporación de una alteración genética en una o más de las secuencias génicas codificantes. Los genes codificantes seleccionados como diana para la alteración pueden ser uno, algunos o todos los genes que codifican enzimas implicadas en la actividad catalítica. Por ejemplo, cuando una única enzima está implicada en una actividad catalítica seleccionada como diana, la alteración puede producirse mediante una alteración genética que reduce o destruye la actividad catalítica del producto génico codificado. De manera similar, cuando la única enzima es multimérica, incluyendo heteromérica, la alteración puede producirse mediante una alteración genética que reduce o destruye la función de una o todas las subunidades de los productos génicos codificados. La destrucción de la actividad puede conseguirse mediante la pérdida de la actividad de unión de una o más subunidades con el fin de formar un complejo activo, mediante la destrucción de la subunidad catalítica del complejo multimérico o mediante ambos. Otras funciones de la actividad y asociación de proteína multimérica también pueden seleccionarse como diana con el fin de alterar una reacción metabólica de la divulgación. Tales otras funciones las conocen bien los expertos en la técnica. Además, algunas o todas las funciones de un único polipéptido o complejo multimérico pueden alterarse según la divulgación con el fin de reducir o suprimir la actividad catalítica de una o más enzimas implicadas en una reacción o modificación metabólica de la divulgación. De manera similar, algunas o todas las enzimas implicadas en una reacción o modificación metabólica de la divulgación pueden alterarse siempre que la reacción seleccionada como diana se reduzca o se destruya.

Dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica también entenderán que una reacción enzimática puede alterarse reduciendo o eliminando reacciones codificadas por un gen común y/o por uno o más ortólogos de ese gen que presentan actividad similar o sustancialmente igual. La reducción de tanto el gen común como de todos los ortólogos puede conducir a la supresión completa de cualquier actividad catalítica de una reacción seleccionada como diana. Sin embargo, la alteración de o bien el gen común o bien uno o más ortólogos puede conducir a una reducción en la actividad catalítica de la reacción seleccionada como diana suficiente para promover el acoplamiento del crecimiento a la biosíntesis de productos. Se ejemplifican en el presente documento tanto los genes comunes que codifican actividades catalíticas para una variedad de modificaciones metabólicas así como sus ortólogos. Los expertos en la técnica entenderán que la alteración de algunos o todos los genes que codifican una enzima de una reacción metabólica seleccionada como diana puede ponerse en práctica en los métodos de la divulgación e incorporarse en los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación con el fin de lograr la producción de productos acoplada al crecimiento.

A continuación en el presente documento se describen los diseños identificados para aumentar la producción de LCA en *Escherichia coli*. El algoritmo OptKnock identificó diseños basados en un modelo estequiométrico de metabolismo de *Escherichia coli*. Las suposiciones incluyen (i) una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de dw/h; (ii) condiciones anaerobias o microaerobias; y (iii) un requisito de mantenimiento asociado a ausencia de crecimiento mínimo de 3 mmol/g de dw/h. Se eligió dodecanol, una molécula C₁₂, como alcohol de cadena larga a modo de ejemplo cuya producción puede acoplarse al crecimiento siguiendo las enseñanzas de esta divulgación. Aunque se supuso que la glucosa era el sustrato de crecimiento, se entiende que las estrategias pueden aplicarse a cualquier sustrato incluyendo glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa o glicerol. En la tabla 1 se enumera el conjunto completo de diseños de producciones de LCA acopladas al crecimiento. Los nombres de las enzimas, sus abreviaturas y las correspondientes estequiometrías de reacción se enumeran en la tabla 2. Finalmente, en la tabla 3 se enumeran los nombres de metabolitos correspondientes a las abreviaturas en las ecuaciones de reacción. Aunque se identificaron los diseños usando un modelo metabólico de metabolismo de *E. coli*, y los nombres de los

genes enumerados en la tabla 2 son específicos para *E. coli*, el método de elección de las estrategias de ingeniería metabólica y también los propios diseños pueden aplicarse a cualquier organismo productor de LCA. Por tanto los diseños son esencialmente listas de transformaciones enzimáticas cuya actividad debe o bien eliminarse, atenuarse o bien está inicialmente ausente de un microorganismo para permitir la producción acoplada al crecimiento de alcoholes de cadena larga.

Un criterio para priorizar la selección final de diseños era el rendimiento de dodecanol acoplado al crecimiento. Para examinar esto, se construyeron conos de producción para cada estrategia en primer lugar maximizando y, posteriormente, minimizando los rendimientos de dodecanol a diferentes velocidades de formación de biomasa (tal como se describe en la sección previa). Si el límite más a la derecha de todos los posibles fenotipos de la red mutante es un único punto, implica que hay un único rendimiento óptimo del producto a la velocidad de formación de biomasa máxima posible en la red. En otros casos, el límite más a la derecha de los fenotipos viables es una línea vertical, indicando que en el punto de biomasa máxima la red puede producir cualquier cantidad del dodecanol en el intervalo calculado, incluyendo la menor cantidad en el punto más bajo de la línea vertical. A tales diseños se les dio una propiedad inferior. Se proporciona una lista corta de los diseños OptKnock de prioridad más alta en el presente documento en la tabla I que representa un subconjunto de los diseños de la tabla 1.

TABLA I

Diseño	Actividad enzimática	Abreviatura	Otras notas
I	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa D-Lactato deshidrogenasa	ADHEr LDH_D	
II	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa D-Lactato deshidrogenasa Piruvato formiato liasa	ADHEr LDH_D PFLi	Diseño I + PFL
III	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa D-Lactato deshidrogenasa Piruvato formiato liasa Fumarato reductasa	ADHEr LDH_D PFLi FRD2	Diseño II + FRD2
IV	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa D-Lactato deshidrogenasa Piruvato formiato liasa Fumarasa	ADHEr LDH_D PFLi FUM	Diseño II + FUM
V	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa D-Lactato deshidrogenasa Piruvato formiato liasa Malato deshidrogenasa	ADHEr LDH_D PFLi MDH	Diseño II + MDH
VI	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa D-Lactato deshidrogenasa Piruvato formiato liasa Fumarato reductasa Glutamato deshidrogenasa	ADHEr LDH_D PFLi FRD2 GLUDy	Diseño III + GLUDy
VII	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa D-Lactato deshidrogenasa Piruvato formiato liasa Fumarasa Glutamato deshidrogenasa	ADHEr LDH_D PFLi FUM GLUDy	Diseño IV + GLUDy
VIII	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa D-Lactato deshidrogenasa Piruvato formiato liasa Malato deshidrogenasa Glutamato deshidrogenasa	ADHEr LDH_D PFLi MDH GLUDy	Diseño V + GLUDy
IX	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa D-Lactato deshidrogenasa	ADHEr LDH_D	Diseño III + THD2

	Piruvato formiato liasa	PFLi	
	Fumarato reductasa	FRD2	
	NAD(P) transhidrogenasa	THD2	
X	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño IV + THD2
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Piruvato formiato liasa	PFLi	
	Fumarasa	FUM	
	NAD(P) transhidrogenasa	THD2	
XI	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño V + THD2
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Piruvato formiato liasa	PFLi	
	Malato deshidrogenasa	MDH	
	NAD(P) transhidrogenasa	THD2	
XII	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño I + PTAr y/o ACKr
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa	PTAr y/o ACKr	
XIII	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño XII + FRD2
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa	PTAr y/o ACKr	
	Fumarato reductasa	FRD2	
XIV	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño XII + FUM
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa	PTAr y/o ACKr	
	Fumarasa	FUM	
XV	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño XII + MDH
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Fosfotransacetilasa y/o acetato cinasa	PTAr y/o ACKr	
	Malato deshidrogenasa	MDH	
XVI	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño I + FRD
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Fumarato reductasa	FRD2	
XVII	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño I + FUM
	D-lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Fumarasa	FUM	
XVIII	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño I + MDH
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Malato deshidrogenasa	MDH	
XIX	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño XVI + ATPS4r
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Fumarato reductasa	FRD2	
	ATP sintasa	ATPS4r	
XX	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño XVII + ATPS4r
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Fumarasa	FUM	
	ATP sintasa	ATPS4r	
XXI	Acetaldehído-CoA deshidrogenasa	ADHEr	Diseño XVIII + ATPS4r
	D-Lactato deshidrogenasa	LDH_D	
	Fumarato reductasa	MDH	
	ATP sintasa	ATPS4r	

Todos los diseños acoplados al crecimiento en este documento se construyen con el diseño I que requiere la

alteración conjunta de las actividades acetilaldehído-CoA deshidrogenasa (ADHEr) y lactato deshidrogenasa (LDH_D) para reducir la formación de etanol y lactato, respectivamente. Se predice que va a lograrse un rendimiento de dodecanol de 0,14 mol/mol de glucosa tras lograr una velocidad de crecimiento máxima de 0,20 l/h (diseño I, figura 3). El diseño II especifica la eliminación, atenuación o ausencia de ADHEr, LDH_D y piruvato formiato liasa (PFLi) y se predice que da como resultado un rendimiento de dodecanol de 0,28 mol/mol de glucosa al crecimiento máximo tal como se muestra en la figura 4. Se logra un acoplamiento más estrecho de la producción de LCA con el crecimiento mediante la alteración adicional de la actividad fumarato reductasa (FRD2), fumarasa (FUM) o malato deshidrogenasa (MDH) tal como se indica mediante los límites de disolución de los diseños III-V en la figura 4. Se logra un acoplamiento incluso más estrecho de la producción con el crecimiento mediante la alteración adicional de la actividad glutamato deshidrogenasa (GLUDy) o NADP transhidrogenasa (THD2) tal como se muestra en el límite de disolución de los diseños VI - XI en la figura 4. Los diseños VI - XI requieren realmente un rendimiento no insignificante de LCA, específicamente, 0,05 mol de dodecanol/mol de glucosa, para permitir una cantidad mínima de crecimiento celular.

El diseño XII requiere la alteración de la actividad fosfotransacetilasa (PTAr) y/o acetato cinasa (ACKr) además de ADHEr y LDH_D para impedir o disminuir la producción de acetato, etanol y lactato, respectivamente. Se requiere un rendimiento de dodecanol de 0,28 mol/mol para lograr una velocidad de crecimiento máxima de 0,16 l/h suponiendo una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de dw/h tal como se muestra en la figura 5. Se logra un acoplamiento más estrecho de la producción de LCA al crecimiento mediante la alteración adicional de FRD2, FUM o MDH tal como se indica mediante el límite de disolución de los diseños XIII - XV. Los diseños XVI - XVIII especifican que la alteración de la actividad FRD2, FUM o MDH además de ADHEr y LDH_D da como resultado un acoplamiento más estrecho de la producción de dodecanol al crecimiento celular en comparación con el diseño I tal como se muestra en la figura 6. Se predice que la alteración adicional de la actividad ATP sintasa en los diseños XIX - XXI da como resultado un rendimiento de dodecanol de 0,30 mol/mol a una velocidad de crecimiento máxima de 0,13 l/h tal como se muestra en la figura 6. La alteración de esta actividad fuerza al organismo a basarse en la ruta de MI-LCA para la generación de energía. Por consiguiente, se requiere un rendimiento de dodecanol mínimo de 0,05 mol/mol para que se logre cualquier crecimiento suponiendo que el organismo carece de las actividades enumeradas en los diseños XIX - XXI.

Se entiende que la alteración de determinadas actividades además de las enumeradas mediante los diseños I - XXI puede conducir a rendimientos de producción incluso superiores tal como se ilustra en los siguientes ejemplos. El diseño V_A implica la alteración de acetilaldehído-CoA deshidrogenasa (ADHEr), lactato deshidrogenasa (LDH_D), malato deshidrogenasa (MDH), piruvato formiato liasa (PFLi), L-aspartasa (ASPT), piruvato cinasa (PYK), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDHy) y dihidroxiacetona fosfotransferasa (DHAPT). Tras la adición de la ruta de MI-LCA, se predice que una cepa modificada por ingeniería genética que contiene alteraciones en estas actividades tiene un rendimiento de dodecanol acoplado al crecimiento de 0,327 mol/mol de glucosa a la velocidad de crecimiento máxima de 0,02 l/h (figura 7, punto A). Esto corresponde al 98 % del rendimiento teórico máximo de 0,333 mol de dodecanol/mol de glucosa. La velocidad de crecimiento máxima de una cepa de este tipo se predice que es de aproximadamente el 10 % de la cepa de tipo natural al tiempo que se requiere un rendimiento de dodecanol mínimo de 0,09 mol/mol para el crecimiento (figura 7, punto B). Puede construirse una cepa recombinante que contiene una actividad reducida de estas funcionalidades en una única etapa o en etapas posteriores, por ejemplo, alterando 2-3 actividades cada etapa. Por ejemplo, puede modificarse por ingeniería genética *E. coli* para la producción de LCA acoplada al crecimiento eliminando en primer lugar genes que codifican las actividades ADHEr y LDH_D dando como resultado el diseño I. Entonces se construye el diseño V mediante la delección adicional de genes responsables de las actividades MDH y PFLi. Entonces puede construirse el diseño V_A delecionando genes que codifican las actividades ASPT, PYK, G6PDHy y DHAPT. Finalmente, obsérvese que varias actividades (es decir, 6-fosfogluconolactonasa (PGL), fosfogluconato deshidratasa (PGDHY) o 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolasa (EDA)) pueden reemplazar a G6PDHy para la alteración y producir las mismas características que el diseño V_A.

El diseño XII_A implica la alteración de acetilaldehído-CoA deshidrogenasa (ADHEr), lactato deshidrogenasa (LDH_D), acetato cinasa (ACKr) y/o fosfotransacetilasa (PTAr), glutamato deshidrogenasa (NADP) (GLUDy), fosfogluconato deshidrogenasa (PGDH) y glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI). El diseño XII_B implica la alteración de acetilaldehído-CoA deshidrogenasa (ADHEr), lactato deshidrogenasa (LDH_D), acetato cinasa (ACKr) y/o fosfotransacetilasa (PTAr), glutamato deshidrogenasa (NADP) (GLUDy), fosfogluconato deshidrogenasa (PGDH), glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI) y transporte de D-glucosa por medio de PEP:Pyr PTS (GLCpts). Tras la adición de la ruta de MI-LCA, se predice que una cepa modificada por ingeniería genética que carece de las actividades especificadas por el diseño XII_B tiene un rendimiento de dodecanol acoplado al crecimiento de 0,322 mol/mol de glucosa a la velocidad de crecimiento máxima de 0,04 l/h (figura 8, punto A). Esto corresponde al 97 % del rendimiento teórico máximo de 0,333 mol de dodecanol/mol de glucosa. La velocidad de crecimiento máxima de una cepa de este tipo se predice que es de aproximadamente el 20 % de la cepa de tipo natural al tiempo que se requiere un rendimiento de dodecanol mínimo de 0,05 mol/mol para el crecimiento (figura 8, punto B). Puede construirse una cepa recombinante que contiene actividad reducida de estas funcionalidades en una única etapa o en etapas posteriores, por ejemplo, eliminando actividades adicionales cada etapa. Por ejemplo, puede modificarse por ingeniería genética *E. coli* para la producción de LCA acoplada al crecimiento eliminando en primer lugar genes que codifican las actividades ADHEr y LDH_D dando como resultado el diseño I. Entonces se construye el diseño XII

mediante la delección adicional de genes que codifican las actividades PTAr y/o ACKr. Entonces se construye el diseño XII_A deleccionando los genes responsables de las actividades GLUDy, PGDH y PGI. Finalmente, se construye el diseño XII_B deleccionando adicionalmente un gen esencial para la actividad GLCpts.

Por consiguiente, la divulgación también proporciona un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene un conjunto de modificaciones metabólicas que acoplan la producción de LCA al crecimiento del organismo, el conjunto de modificaciones metabólicas incluye la alteración de uno o más genes seleccionados del conjunto de genes que codifican proteínas que incluyen una acetilaldehído-CoA deshidrogenasa y una lactato deshidrogenasa.

La presente divulgación también proporciona una cepa que carece de las actividades enumeradas para el diseño I anterior que carece además de al menos una de las siguientes actividades: piruvato formiato liasa (PFLi), fosfotransacetilasa (PTAr), acetato cinasa (ACKr), fumarato reductasa (FRD2), fumarasa (FUM) o malato deshidrogenasa (MDH) tal como se ejemplifica mediante los diseños II, XII, XVI, XVII y XVIII.

Además, la divulgación proporciona una cepa que carece de las actividades enumeradas para el diseño II anterior y carece además de al menos una de las siguientes actividades: fumarato reductasa (FRD2), fumarasa (FUM) o malato deshidrogenasa (MDH) tal como se ejemplifica mediante los diseños III, IV y V.

Además, la divulgación proporciona cepas que carecen de las actividades enumeradas para los diseños III, IV o V, anteriores y carece además de actividad glutamato deshidrogenasa (GLUDy) tal como se ejemplifica mediante los diseños VI, VII y VIII.

La divulgación también proporciona cepas que carecen de las actividades enumeradas para los diseños III, IV o V, anteriores, y carece además de actividad NAD(P) transhidrogenasa (THD2) tal como se ejemplifica mediante los diseños IX, X y XI.

Además, la divulgación proporciona una cepa que carece de las actividades enumeradas para el diseño XII anterior y carece además de al menos una de las siguientes actividades: fumarato reductasa (FRD2), fumarasa (FUM) o malato deshidrogenasa (MDH) tal como se ejemplifica mediante los diseños XIII, XIV y XV.

Finalmente, la divulgación proporciona cepas que carecen de las actividades enumeradas para los diseños XVI, XVII y XVIII, anteriores, y carece además de actividad ATP sintasa (ATPS4r) tal como se ejemplifica mediante los diseños XIX, XX y XXI.

A continuación en el presente documento se describen las rutas identificadas para aumentar la producción de LCA en *S. cerevisiae*. El algoritmo OptKnock, descrito en el presente documento adicionalmente más adelante, identificó diseños basados en un modelo estequiométrico de metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. Las suposiciones incluyen (i) una velocidad de captación de glucosa de 10 mmol/g de dw/h; (ii) condiciones anaerobias o microaerobias; y (iii) un requisito de mantenimiento asociado a ausencia de crecimiento mínimo de 3 mmol/g de dw/h. Se eligió dodecanol, una molécula C₁₂, como alcohol de cadena larga a modo de ejemplo cuya producción puede acoplarse al crecimiento siguiendo las enseñanzas de esta divulgación. Aunque se supuso que la glucosa era el sustrato de crecimiento, se entiende que los métodos pueden aplicarse a cualquier sustrato incluyendo glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa o glicerol. Aunque los diseños se identificaron usando un modelo metabólico de metabolismo de *S. cerevisiae*, el método de elección de la modificación por ingeniería metabólica de rutas y también los propios diseños pueden aplicarse a cualquier organismo eucariota productor de LCA. Por tanto, los diseños son esencialmente listas de transformaciones enzimáticas cuya actividad debe o bien eliminarse, atenuarse o inicialmente está ausente de un microorganismo para permitir la producción de alcoholes de cadena larga.

Un criterio para priorizar la selección final de rutas fue el rendimiento de dodecanol. Para examinar esto, se construyeron conos de producción para cada conjunto de rutas en primer lugar maximizando y, posteriormente, minimizando los rendimientos de dodecanol a diferentes velocidades de formación de biomasa. Si el límite más a la derecha de todos los posibles fenotipos de la red mutante es un único punto, implica que hay un único rendimiento óptimo del producto a la velocidad de formación de biomasa máxima posible en la red. En otros casos, el límite más a la derecha de los fenotipos viables es una línea vertical, indicando que en el punto de biomasa máxima la red puede producir cualquier cantidad del dodecanol en el intervalo calculado, incluyendo la menor cantidad en el punto más bajo de la línea vertical. A tales diseños se les dio una propiedad inferior.

Los organismos de la presente divulgación pueden cultivarse en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio o un medio de cultivo microaerobio tal como se detalla a continuación en el presente documento adicionalmente. Tales organismos tienen una o más alteraciones génicas que pueden incluir la delección completa en algunas realizaciones, o alteración mediante eliminación o cambios en porciones funcionales codificadas por fragmentos de todo el gen.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona organismos eucariotas microbianos que no se producen de manera natural que producen LCA en el citosol. Obsérvese que citosol en el presente documento se refiere a cualquier compartimento fuera de la mitocondria. En tales realizaciones, una o más alteraciones génicas en

el organismo eucariota que codifica una enzima incluyen, por ejemplo, una piruvato descarboxilasa citosólica, una piruvato deshidrogenasa mitocondrial, una alcohol deshidrogenasa específica de etanol citosólica y una alcohol deshidrogenasa específica de etanol mitocondrial. Los genes a modo de ejemplo que codifican estas enzimas incluyen, por ejemplo, YLR044C, YLR134W, YGR087C, PDC3, YNL071W, YER178W, YBR221C, YGR193C, YFL018C, YBR145W, YGL256W, YOL086C, YMR303, YMR083W, YPL088W, YAL061W, YMR318C, YCR105W e YDL168W.

Otras alteraciones génicas que codifican una enzima incluyen, por ejemplo, una malato deshidrogenasa citosólica, una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa lanzadera, una NADH deshidrogenasa externa y también puede efectuarse una NADH deshidrogenasa mitocondrial interna. Los genes a modo de ejemplo de esta última incluyen, por ejemplo, YOL126C, YDL022W, YOL059W, YIL155C, YMR145C, YDL085W y YML120C.

Estos organismos pueden incluir también un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima en el citosol incluyendo, por ejemplo, una acetil-CoA sintetasa (que forma AMP), una acetato-CoA ligasa dependiente de ADP, una acetaldehído deshidrogenasa acilante, una piruvato deshidrogenasa, una piruvato:NADP oxidoreductasa y una piruvato formiato liasa, o sus correspondientes regiones reguladoras génicas. También puede incorporarse un ácido nucleico exógeno que codifica una transhidrogenasa citosólica o su región reguladora génica. En algunas realizaciones estos productos génicos pueden expresarse de manera nativa en el citosol, mientras que en otras realizaciones, pueden sobreexpresarse, por ejemplo, añadiendo copias del gen a partir de la misma fuente o a partir de otros organismos, o introduciendo o cambiando regiones reguladoras génicas. Tales regiones reguladoras génicas incluyen, por ejemplo, promotores alternativos, promotores inducibles, promotores variantes o potenciadores para potenciar la expresión génica. La alteración funcional de elementos reguladores negativos tales como represores y/o silenciadores también puede emplearse para potenciar la expresión génica. Pueden hacerse modificaciones similares en regiones reguladoras de la traducción para potenciar la síntesis de polipéptidos e incluyen, por ejemplo, la sustitución de un sitio de unión al ribosoma por una secuencia consenso u óptima y/o la eliminación de estructuras secundarias.

Estos organismos maximizan la disponibilidad de acetil CoA, ATP y equivalentes reductores (NADH) para la producción de dodecanol. Acetil CoA es el precursor de carbono primario para la producción de LCA por medio de la ruta de MI-LCA propuesta. Todas las reacciones que permiten la formación de dodecanol por medio de la ruta independiente de malonil-CoA son operativas en el citosol. Específicamente, cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa funcionan en la dirección apropiada para formar acil CoA que luego se reduce a aldehído graso y dodecanol por medio de acil CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa.

La introducción de la ruta de MI-LCA en el citosol impidió cualquier flujo a través de la piruvato deshidrogenasa nativa *in silico*. En condiciones anaerobias y en condiciones en las que las concentraciones de glucosa son altas en el medio, la capacidad de esta enzima mitocondrial es muy limitada y no hay ningún flujo significativo a través de la misma. Sin embargo, en algunas realizaciones, esta enzima puede deletarse o atenuarse para aumentar la producción de LCA.

En una divulgación, la producción de LCA en el citosol usa la acetil-CoA sintetasa que forma AMP. La producción de dodecanol en el citosol se basa en la maquinaria celular nativa para proporcionar los precursores necesarios en la producción de LCA. Una mayoría del flujo de piruvato generado mediante glicólisis se canaliza a la formación de acetil CoA por medio de la derivación de piruvato deshidrogenasa compuestas por la piruvato descarboxilasa, la acetaldehído deshidrogenasa y la acetil-CoA sintetasa que forma AMP (figura 9a). Se notifica que esta derivación tiene un flujo significativo a su través incluso en condiciones aerobias a altas concentraciones de glucosa (Pronk *et al.*, Yeast 12:1607-1633 (1996)).

La última etapa de la derivación que convierte acetato en acetil-CoA está catalizada por acetil-CoA sintetasa, codificada por los genes ACS1 y ACS2. Puesto que ACS2 se expresa de manera constitutiva en glucosa y está presente en el citosol entre otros compartimentos, en algunas divulgaciones el organismo eucariota que no se produce de manera natural se modifica por ingeniería genética para que sobreexpresa ACS2. En otras realizaciones el gen ACS2 se reemplaza por un ACS mutante de *Salmonella enterica* (id de Genbank NP_807785.1) que no se somete a modificación postraduccional y tiene una actividad superior en *S. cerevisiae* en comparación con ACS1 o ACS2 (Shiba *et al.*, Metab Eng. 9:160-168 (2007)).

La acetil CoA sintetasa que genera AMP usa dos equivalentes de ATP para la conversión de cada molécula de acetato en acetil CoA ($\text{CoA} + \text{acetato} + \text{ATP} \rightarrow \text{acetil-CoA} + \text{PPi} + \text{AMP}$). En condiciones anaerobias, cuando está disponible energía solo a través de fosforilación a nivel de sustrato, la producción de dodecanol por medio de la acetil CoA sintetasa que forma AMP no es energéticamente favorable. Por tanto, una pequeña cantidad de oxígeno se pone a disposición de la célula para satisfacer sus requisitos energéticos, aumentando simultáneamente la conversión de acetato en acetil CoA.

La producción de dodecanol puede mejorarse mediante la alteración de alcohol deshidrogenasas específicas de etanol para impedir que se usen acetil-CoA y NADH para la producción de etanol. Adicionalmente, la producción de LCA se beneficia de impedir que se use NADH en la cadena de transporte de electrones respiratoria. Por tanto, se

introducen alteraciones en la NADH deshidrogenasa mitocondrial interna, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa lanzadera (que consiste en glicerol-3-fosfato deshidrogenasa unida a NADH citosólica y una glicerol-3-fosfato:ubiquinona oxidoreductasa unida a la membrana) (Bakker *et al.*, FEMS Microbiol. Rev. 25:15-37 (2001)) y la NADH deshidrogenasa externa en algunas realizaciones. Además, también se altera la malato deshidrogenasa citosólica que retrae potencialmente NADH de la producción de dodecanol. Se muestra una envuelta de producción acoplada al crecimiento tras imponer estas alteraciones en gris oscuro en la figura 9b y se compara con las características de producción de dodecanol en condiciones aerobias.

En algunas divulgaciones el organismo eucariota que no se produce de manera natural incorpora un gen exógeno que codifica una acetato CoA ligasa que forma ADP. En esta divulgación la acetil CoA sintetasa que forma AMP en el citosol se reemplaza por la acetato CoA ligasa que forma ADP ($\text{CoA} + \text{acetato} + \text{ATP} \rightarrow \text{acetil-CoA} + \text{Pi} + \text{ADP}$) (figura 10a). Los genes exógenos para introducir acetato CoA ligasa incluyen, por ejemplo, *acdA* y *acdB* de *Pyrococcus furiosus* (Glasemacher *et al.*, Eur. J. Biochem. 244:561-567 (1997)) (Mai y Adams, J. Bacteriol. 178: 5897-5903 (1996)). La introducción de esta enzima que usa un equivalente de ATP para la formación de cada molécula de acetil CoA (en contraposición a 2 equivalentes de ATP) permite que la producción de dodecanol sea energéticamente neutra. En esta divulgación se usa una pequeña cantidad de oxígeno u otra respiración aceptora de electrones para generar energía para soportar el crecimiento. Tales pequeñas cantidades de oxígeno se denominan condiciones microaerobias, tal como se describe adicionalmente más adelante. En algunas divulgaciones las alcohol deshidrogenasas específicas de etanol se alteran para impedir la formación de etanol. En divulgaciones que incorporan CoA ligasa, puede introducirse una o más de las siguientes inactivaciones para la producción de LCA: malato deshidrogenasa citosólica, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa lanzadera, la NADH deshidrogenasa externa y la NADH deshidrogenasa mitocondrial interna. La producción acoplada al crecimiento tras la imposición de estas alteraciones se muestra en la figura 10b en gris oscuro. La curva negra muestra la envuelta de producción para la cepa de tipo natural en condiciones aerobias y la curva gris claro muestra la envuelta cuando la red se aumenta con acetato-CoA ligasa. Obsérvese el aumento en el rendimiento teórico máximo de dodecanol tras la introducción de esta enzima.

En algunas divulgaciones el organismo eucariota que no se produce de manera natural incorpora un gen exógeno que codifica una acetaldehído deshidrogenasa acilante. La mejora en las características energéticas del proceso de dodecanol puede conseguirse usando la acetaldehído deshidrogenasa acilante ($\text{acetaldehído} + \text{CoA} + \text{NAD} \rightarrow \text{acetil-CoA} + \text{NADH}$) para la conversión de acetaldehído en acetil CoA (figura 11a). Los beneficios del uso de esta enzima son que (i) no se gasta energía para la producción de acetil CoA, y (ii) se forma una molécula de NADH por cada molécula de acetil CoA formada. Por tanto, los equivalentes reductores necesarios para la producción de acetil CoA también pueden generarse. La introducción de esta enzima permite la producción de LCA en condiciones anaerobias.

Se ha notificado la acetaldehído deshidrogenasa acilante en varias bacterias, incluyendo *Acetobacterium woodii* (Mai y Adams, J. Bacteriol. 178:5897-5903 (1996)), *Clostridium kluyveri* (Seedorf *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105:2128-2133 (2008); Smith y Kaplan, Arch. Biochem. Biophys. 203:663-675(1980)), *Clostridium beijerinckii* (Yan *et al.*, Appl. Environ. Microbiol 56:2591-2599 (1990)), y en especies de *Pseudomonas* tales como la cepa CF600 (Lei *et al.*, Biochemistry 47:6870-6882 (2008); Manjasetty *et al.*, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 57:582-585 (2001)). En la tabla 5 a continuación se muestran las id de Genbank de genes.

Tabla 5

<i>Ald</i>	YP_001394464.1	<i>Clostridium kluyveri</i>
<i>dmpF</i>	CAA43226.1	<i>Pseudomonas sp. CF600</i>
<i>bphG</i>	BAA03892.1	<i>Pseudomonas sp</i>
<i>mhpD</i>	NP_414884.1	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655

En algunas divulgaciones cada una de las cepas anteriores puede complementarse con alteraciones adicionales. Alternativamente, algunas otras enzimas que no se sabe que presenten actividad significativa en las condiciones de crecimiento pueden volverse activas debido a evolución adaptativa o mutagénesis al azar y también pueden alterarse.

La producción acoplada al crecimiento anaerobia de dodecanol (o cualquier LCA) puede conseguirse alterando la actividad alcohol deshidrogenasa específica de etanol. La introducción de una acetaldehído deshidrogenasa acilante, con sus características energéticas favorables, impide o reduce el flujo de carbono a través de la acetaldehído deshidrogenasa nativa y la acetil-CoA sintetasa. En la figura 11b se muestra la envuelta de producción. La red de *S. cerevisiae* de tipo natural (negro) puede formar solo pequeñas cantidades de dodecanol como subproducto del crecimiento en condiciones anaerobias. Cuando la red se aumenta con deshidrogenasa acilante, hay un aumento en el rendimiento máximo teórico en la red, pero no se observa acoplamiento al crecimiento (curva gris claro de puntos). Sin embargo, la alteración de alcohol deshidrogenasa específica de etanol a partir de la red

aumentada muestra que la producción de dodecanol se acopla al crecimiento a la biomasa viable máxima en la red (curva gris oscuro).

En algunas divulgaciones el organismo eucariota que no se produce de manera natural usa una piruvato deshidrogenasa citosólica para la producción de dodecanol. En la figura 12 se muestra la piruvato deshidrogenasa citosólica para generar los precursores para la ruta de MI-LCA. En tales realizaciones, (i) el piruvato se convierte directamente en acetil CoA en el citosol sin el gasto de energía, y (ii) están disponibles más equivalentes reductores para la célula.

En algunas divulgaciones el organismo eucariota que no se produce de manera natural se modifica por ingeniería genética para redirigir la piruvato deshidrogenasa mitocondrial nativa al citosol. En otras divulgaciones se introduce una enzima citosólica heteróloga en el organismo. El redireccionamiento de una enzima a un compartimento diferente puede conseguirse cambiando la secuencia de direccionamiento de la proteína (van Loon y Young, EMBO J. 5:161-165 (1986)). La alteración de la piruvato descarboxilasa nativa permite que una mayoría del flujo de carbono se introduzca en el citosol para su procesamiento por la piruvato deshidrogenasa citosólica. Esto también permite la producción de dodecanol en condiciones anaerobias. La envuelta de producción acoplada al crecimiento es similar a la representada en la figura 11b. Obsérvese que la piruvato descarboxilasa se altera en lugar de la alcohol deshidrogenasa para lograr el acoplamiento al crecimiento en la red.

En algunas divulgaciones el organismo eucariota que no se produce de manera natural usa una piruvato:NADP oxidorreductasa citosólica. La piruvato:NADP oxidorreductasa permite la producción de acetil CoA y equivalentes reductores en el citosol tal como se muestra en la figura 13. La adición de esta enzima permite la producción de acetil CoA sin gastar energía que de otra forma la habría requerido la acetil CoA sintetasa. La enzima se ha purificado de la mitocondria de *Euglena gracilis* y es sensible al oxígeno (Inui *et al.*, Journal of Biochemistry 96:931-934 (1984); Inui *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics 237:423-429 (1985); Inui *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics 274:434-442 (1989); Inui *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics 280:292-298 (1990)). Se usa para generar acetil CoA a partir de piruvato, produciendo simultáneamente NADPH. El gen correspondiente es *pno* y su id de Genbank es: CAC37628.1. Puede dirigirse al citosol eliminando la secuencia de direccionamiento mitocondrial. En algunas realizaciones, se añade también una transhidrogenasa. Esta enzima puede introducirse como un gen exógeno a partir de un organismo tal como *E. coli* para convertir la NADPH generada en NADH (Nissen *et al.*, Yeast 18:19-32 (2001)).

Con sus bajos requisitos de ATP, la ruta es energéticamente favorable incluso en condiciones anaerobias. Para impedir o reducir la utilización de NADH y piruvato para la producción de etanol, la actividad piruvato descarboxilasa puede alterarse. Esto conduce a una producción acoplada al crecimiento de dodecanol similar a la mostrada en la figura 11b.

En algunas divulgaciones un organismo eucariota que no se produce de manera natural usa una piruvato formiato liasa. En tales divulgaciones se usa una piruvato formiato liasa (*pfl*) citosólica heteróloga para generar tanto acetil CoA como NADH tal como se muestra en la figura 14. Esta enzima es activa normalmente en condiciones anaerobias en organismos tales como *E. coli*. La falta de requisito de energía para la conversión de piruvato en acetil CoA hace que la producción de dodecanol sea viable en condiciones anaerobias.

La conversión de piruvato en acetil CoA va acompañada por la producción de formiato. Este se metaboliza por la formiato deshidrogenasa nativa, conduciendo a la generación adicional de equivalentes reductores en cantidades estequiométricas. En algunas realizaciones que usan este diseño de cepa, pueden alterarse una o más de las tres piruvato descarboxilasas, *PDC1*, *PDC5* y *PDC6*. Las id de Genbank de genes a modo de ejemplo que codifican piruvato formiato liasa se muestran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

<i>pflB</i>	NP_415423.1	<i>Escherichia coli</i>
<i>pfl</i>	YP_001588758.	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>pfl</i>	YP_001394497.1	<i>Clostridium kluyveri</i>

La alteración de la piruvato descarboxilasa junto con la introducción de una piruvato formiato liasa heteróloga en la red conduce a una producción acoplada al crecimiento de dodecanol. La curva de producción es similar a la que se muestra en la figura 11b.

Aunque los organismos eucariotas que no se producen de manera natural descritos anteriormente producen LCA en el citosol, también es posible producir LCA en la mitocondria. A continuación en el presente documento se detallan diseños a modo de ejemplo para la distribución del flujo de carbono hacia la producción de dodecanol. Los organismos que producen LCA en la mitocondria incluyen una o más alteraciones en genes que codifican enzimas tales como una piruvato descarboxilasa citosólica, una alcohol deshidrogenasa específica de etanol citosólica y una

alcohol deshidrogenasa específica de etanol mitocondrial. Los genes a modo de ejemplo que codifican estas enzimas incluyen, por ejemplo, ILR044C, ILR134W, YGR087C, PDC3, YBR145W, YGL256W, YOL086C, YMR303, YMR083W, YPL088W, YAL061W, YMR318C, YCR105W e YDL168W.

5 Otras alteraciones de genes incluyen los que codifican una enzima tal como una malato deshidrogenasa citosólica, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa lanzadera, catalizada por la NADH deshidrogenasa externa y NADH deshidrogenasa interna. Los genes a modo de ejemplo de esta última incluyen, por ejemplo, YOL126C, YDL022W, YOL059W, YIL155C, YMR145C, YDL085W e YML120C.

10 Los organismos que producen LCA en la mitocondria pueden incluir también un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima tal como una piruvato deshidrogenasa, una piruvato: NADP oxidorreductasa, una piruvato formiato liasa, una acetaldehído deshidrogenasa acilante, una acetato CoA ligasa y una acetil CoA sintetasa que forma AMP o sus correspondientes regiones reguladoras génicas tal como se describió anteriormente. De manera adicional, tales organismos se benefician de los sistemas lanzadera que transportan NADH potenciados para el transporte de NADH desde el citosol hasta la mitocondria. Otros ácidos nucleicos exógenos que codifican una enzima que pueden insertarse en tales organismos incluyen una transhidrogenasa, formiato deshidrogenasa, una piruvato descarboxilasa y una piruvato oxidasa, todas en la mitocondria, o sus correspondientes regiones reguladoras génicas.

20 En una divulgación se usa una piruvato deshidrogenasa mitocondrial en el organismo eucariota que no se produce de manera natural. Esta puede ser la piruvato deshidrogenasa nativa que produce tanto acetil CoA como NADH tal como se muestra en la figura 15a. Puesto que no hay ningún requisito de energía para la conversión de piruvato en acetil CoA por medio de esta ruta; la producción de dodecanol, por ejemplo, es energéticamente favorable incluso en condiciones anaerobias.

25 Se sabe que la piruvato deshidrogenasa mitocondrial es activa en tanto en condiciones aerobias como anaerobias en *S. cerevisiae* (Pronk *et al.*, Yeast 12:1607-1633 (1996)). En algunas divulgaciones la enzima se sobreexpresa en su forma nativa o heteróloga. La enzima nativa puede sobreexpresarse usando un promotor más fuerte. Adicionalmente, pueden introducirse mutaciones dirigidas a aumentar su actividad en condiciones anaerobias (Kim *et al.*, J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)). Los equivalentes reductores generados en el citosol se ponen a disposición en la mitocondria para la producción de dodecanol usando las lanzaderas redox presentes en *S. cerevisiae*. Obsérvese que estas lanzaderas transportan NADH a la mitocondria para la generación de energía en condiciones respiratorias (Overkamp *et al.*, J. Bacteriol. 182:2823-2830 (2000)). Para la producción acoplada al crecimiento, se altera la actividad piruvato descarboxilasa para que el flujo de piruvato se dirija hacia piruvato deshidrogenasa y para inhibir la formación de etanol. La curva de producción para la red mutante se muestra en la figura 15b.

40 En algunas divulgaciones un organismo eucariota que no se produce de manera natural usa una piruvato:NADP-oxidorreductasa heteróloga. La producción de dodecanol en la mitocondria puede lograrse mediante la introducción de la piruvato:NADP oxidorreductasa en la mitocondria tal como se muestra en la figura 16. Esta enzima se purifica a partir de *E. gracilis*. Puesto que la enzima está presente de manera natural en la mitocondria y es activa en condiciones anaerobias, es posible conseguir una alta actividad de la enzima en condiciones anaerobias. La introducción de esta enzima proporciona el precursor acetil CoA para la producción de dodecanol y también equivalentes reductores. La NADPH generada por la enzima se convierte en NADH mediante una transhidrogenasa, que puede introducirse en la mitocondria. Para equivalentes reductores adicionales, las lanzaderas redox necesitan transportar NADH desde el citosol hasta la mitocondria. La producción acoplada al crecimiento de LCA usando esta enzima puede obtenerse mediante la alteración de piruvato descarboxilasa. La curva de producción de la cepa mutante es muy similar a la mostrada en la figura 15b.

50 En algunas divulgaciones, un organismo eucariota que no se produce de manera natural usa una piruvato formiato liasa heteróloga. La producción de dodecanol usando una piruvato formiato liasa en la mitocondria se muestra en la figura 17. Estos genes se han explicado de manera resumida anteriormente en el presente documento. En tales divulgaciones la formiato deshidrogenasa nativa se redirige a la mitocondria para permitir la metabolización adicional de formiato y la generación de más equivalentes reductores. Esta cepa puede adoptarse para portar un flujo suficiente para sostener un alto rendimiento y productividad de la producción de LCA en la mitocondria en ausencia de oxígeno.

60 Son viables condiciones de crecimiento anaerobias para la producción de dodecanol usando este diseño de cepa. Las lanzaderas redox pueden sobreexpresarse para transportar NADH generado en el citosol a la mitocondria. La producción en este escenario es posible alterando la actividad piruvato descarboxilasa citosólica. Las características de producción de la cepa mutante son similares a las mostradas en la figura 15b.

65 En algunas divulgaciones un organismo eucariota que no se produce de manera natural usa una acetaldehído deshidrogenasa heteróloga (acilante). En tales divulgaciones se introduce una acetaldehído deshidrogenasa acilante en la mitocondria para proporcionar tanto acetil-CoA como NADH para la producción de LCA tal como se muestra en la figura 18. Una isozima piruvato descarboxilasa se redirige a la mitocondria para convertir piruvato en acetaldehído

en algunas realizaciones. La expresión de estas dos actividades en la mitocondria es equivalente a la actividad de piruvato deshidrogenasa. La curva de producción acoplada al crecimiento es la misma que la mostrada en la figura 15b. La cepa de producción acoplada al crecimiento tiene la acetaldehído deshidrogenasa mitocondrial nativa (Pronk *et al.*, Yeast 12:1607-1633 (1996)) y la piruvato descarboxilasa citosólica alteradas en algunas realizaciones. En otras divulgaciones la alcohol deshidrogenasa específica de etanol mitocondrial también está alterada para impedir la conversión de acetaldehído en etanol.

En algunas divulgaciones un organismo eucariota que no se produce de manera natural usa una acetil CoA sintetasa mitocondrial (que forma AMP). Tal como se comentó anteriormente, la expresión de esta enzima requiere oxígeno para lograr características energéticas favorables. ACS1, una isozima de acetil CoA sintetasa, se expresa en *S. cerevisiae* en la mitocondria en condiciones aerobias pero está reprimida por glucosa. Esta enzima puede mutarse para eliminar la represión o puede introducirse una enzima heteróloga que se expresa en las condiciones de interés. Adicionalmente, puede expresarse también piruvato descarboxilasa en la mitocondria para formar acetato. *S. cerevisiae*, por ejemplo, ya presenta una acetaldehído deshidrogenasa mitocondrial (Pronk *et al.*, Yeast 12:1607-1633 (1996)). Alternativamente, enzimas tales como piruvato oxidasa pueden expresarse de manera heteróloga para convertir piruvato en acetato. Un candidato a enzima de este tipo es piruvato oxidasa de *E. coli* (id de Genbank: NP_451392.1). Esta enzima se expresa de manera natural en presencia de oxígeno.

La producción de LCA usando este diseño de cepa se beneficia de una o más de las siguientes enzimas alteradas: malato deshidrogenasa citosólica, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa lanzadera, la NADH deshidrogenasa externa y la NADH deshidrogenasa mitocondrial interna. La glicerol-3-fosfato lanzadera está compuesta por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica y la glicerol-3-fosfato:ubiquinona oxidoreductasa unida a la membrana, funcionando también esta última como glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial. En algunas divulgaciones la alcohol deshidrogenasa específica de etanol mitocondrial también está alterada para impedir o reducir la conversión de acetaldehído en etanol. La curva de producción para la cepa de tipo natural con una piruvato descarboxilasa mitocondrial añadida a la red se muestra en negro en la figura 19b. Esta curva se muestra para condiciones aerobias. Las características de producción cuando se imponen las alternaciones mencionadas anteriormente en la red se muestran en gris claro. La regulación por disminución de la parte oxidativa de la ruta de pentosas fosfato, especialmente la etapa de asignación, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, mejora adicionalmente las características de producción de LCA de la red.

En algunas divulgaciones un organismo eucariota que no se produce de manera natural usa una acetato CoA ligasa mitocondrial (que forma ADP). La producción de LCA mitocondrial también puede lograrse usando una acetato-CoA ligasa para convertir acetato en acetil-CoA tal como se muestra en la figura 20. Tal como se describió anteriormente, el uso de esta enzima es energéticamente favorable y la producción de LCA es energéticamente neutra a menos que se suministre oxígeno. La expresión mitocondrial de piruvato descarboxilasa se usa en tales realizaciones. Se obtiene producción de LCA imponiendo alteraciones en la malato deshidrogenasa citosólica, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa lanzadera, la NADH deshidrogenasa externa y la NADH deshidrogenasa interna. La regulación por disminución de la parte oxidativa de la ruta de pentosas fosfato mejora adicionalmente las características de producción acoplada al crecimiento para producir una curva de producción similar a la mostrada en la figura 19b. En algunas divulgaciones la alcohol deshidrogenasa específica de etanol mitocondrial también está alterada para impedir o reducir la conversión de acetaldehído en etanol.

Las estrategias de diseño descritas en el presente documento son útiles no solo para potenciar la producción acoplada al crecimiento, sino que también son muy adecuadas para potenciar la producción no acoplada al crecimiento porque vinculan la producción de alcoholes de cadena larga a la generación de energía y/o equilibrio redox.

Los métodos de producción no acoplada al crecimiento a modo de ejemplo incluyen implementar una base de crecimiento aerobio seguida por una fase de producción anaerobia. Por ejemplo, Vemuri *et al.* J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (6):325-332, (2002) describen un procedimiento de dos fases para la producción de succinato en *E. Coli*. Okino *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 6 de septiembre. (2008) [disponible actualmente en edición en línea] describen un procedimiento de producción no acoplada al crecimiento similar en una cepa de *Corynebacterium glutamicum*.

Otro método de este tipo implica la retención de un nutriente esencial a partir de un cultivo celular propagado, limitando de ese modo el crecimiento, pero sin impedir la producción tal como se describe en Durner *et al.* Appl. Environ. Microbiol. (8):3408-3414(2000). Aún otra estrategia dirigida a desacoplar el crecimiento de la producción implica reemplazar el sustrato de crecimiento por otro compuesto que puede metabolizarse más lentamente tal como se describe en Altamirano *et al.* Biotechnol. Bioeng. 76:351-360 (2001). La formación de productos desacoplada del crecimiento también puede ocasionarse mediante modificaciones genéticas específicas tal como se describe en Blombach *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 79:471-9 (2008).

Algunos organismos microbianos que pueden producir LCA se ejemplifican en el presente documento con referencia a unos antecedentes genéticos de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, con la secuencia genómica completa disponible para más de 550 especies actualmente (con más de la mitad de estas disponibles en bases de datos

- públicas tales como el NCBI), incluyendo 395 genomas de microorganismos y una variedad de genomas de levaduras, hongos, plantas y mamíferos, la identificación de un homólogo de especie alternativo para uno o más genes, incluyendo por ejemplo, desplazamientos de genes ortólogos, parálogos y no ortólogos, y el intercambio de alteraciones genéticas entre organismos es rutinario y bien conocido en la técnica. Por consiguiente, las alteraciones metabólicas que permiten la producción acoplada al crecimiento de LCA descrita en el presente documento con referencia a un organismo particular tal como *Escherichia coli* pueden aplicarse fácilmente a otros microorganismos. Dadas las enseñanzas y la guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica ejemplificada en un organismo puede aplicarse igualmente a otros organismos.
- Los métodos de la divulgación pueden aplicarse a diversos organismos eucariotas tales como levaduras y hongos. Las levaduras pueden incluir *S. cerevisiae* y *Rhizopus arrhizus*, por ejemplo. Las especies eucariotas a modo de ejemplo incluyen las seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Candida albicans*, *Candida boidinii* y *Pichia pastoris*. Adicionalmente, también pueden aplicarse células seleccionadas de organismos eucariotas más grandes a los métodos de la presente divulgación.
- Pueden insertarse genes en *S. cerevisiae*, usando varios métodos; algunos de estos se basan en plásmidos mientras que otros permiten la incorporación del gen en el cromosoma. Este último enfoque emplea un vector de expresión basado en promotor integrador, por ejemplo, el vector pGAPZ o el pGAPZa basado en el promotor GAP. El vector de expresión constituye el promotor GAP, el alelo de tipo natural HIS4 para la integración y la región de terminación de la transcripción AOX en 3' de *P. pastoris* además de un casete KanMX, flanqueado por sitios loxP que permiten la eliminación y el reciclaje del marcador de resistencia. Los vectores están disponibles comercialmente de Invitrogen. Los detalles de los que se elaboran en el ejemplo más adelante.
- Las cepas modificadas por ingeniería genética se caracterizan mediante la medición de la velocidad de crecimiento, la velocidad de captación de sustrato y la velocidad de secreción de productos/subproductos. Se hacen crecer los cultivos durante la noche y se usan como inóculo para un cultivo discontinuo nuevo para el que se toman mediciones durante el crecimiento exponencial. La velocidad de crecimiento se determina midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (A600). Las concentraciones de glucosa, alcoholes y otros subproductos de ácidos orgánicos en el sobrenadante de cultivo se determinarán mediante métodos analíticos incluyendo HPLC usando una columna HPX-87H (BioRad), o CG-EM, y se usan para calcular las velocidades de captación y secreción. Todos los experimentos se realizan con cultivos por triplicado.
- La divulgación también proporciona un método para producir alcoholes de cadena larga cultivando el organismo eucariota que no se produce de manera natural descrito anteriormente en el presente documento. Las una o más alteraciones génicas se producen en genes que codifican una enzima para acoplar la producción de alcoholes de cadena larga al crecimiento del organismo cuando la alteración génica reduce una actividad de la enzima. Las una o más alteraciones génicas confieren producción acoplada al crecimiento estable de alcoholes de cadena larga en el organismo. En divulgaciones alternativas, las alteraciones génicas pueden potenciar la producción de LCA de una manera no dependiente del crecimiento.
- Cada una de las cepas presentadas en el presente documento puede complementarse con alteraciones adicionales si se determina que los diseños de cepas predichos no acoplan suficientemente la formación de LCA con la formación de biomasa. Sin embargo, la lista de conjuntos de alteraciones génica proporcionada en el presente documento sirve como punto de partida excelente para la construcción de cepas de producción de LCA acoplada al crecimiento de alto rendimiento.
- Cada una de las cepas propuestas puede complementarse con alteraciones adicionales si se determina que los diseños de cepas predichos no acoplan suficientemente la formación del producto con la formación de biomasa. Alternativamente, algunas otras enzimas que no se sabe que presenten actividad significativa en las condiciones de crecimiento pueden volverse activas debido a evolución adaptativa o mutagénesis al azar y también pueden alterarse. Sin embargo, la lista de conjuntos de alteraciones génicas proporcionada en el presente documento sirve como punto de partida para la construcción de cepas de producción de LCA acoplada al crecimiento de alto rendimiento.
- Los organismos microbianos que no se producen de manera natural de la divulgación pueden emplearse en la producción acoplada al crecimiento de LCA. Esencialmente puede sintetizarse cualquier cantidad, incluyendo cantidades comerciales, usando los productos de LCA acoplados al crecimiento de la divulgación. Debido a que los organismos de la divulgación acoplan obligatoriamente LCA a procesos de crecimiento continuo o crecimiento casi continuo, son particularmente útiles para la producción biosintética de LCA. Tales procesos de crecimiento continuo y/o casi continuo se describieron anteriormente y se ejemplifican más adelante en el ejemplo I. También se conocen en la técnica procesos de crecimiento continuo y/o casi continuo. Brevemente, los procesos de crecimiento continuo y/o casi continuo implican mantener el microorganismo en una fase logarítmica o de crecimiento exponencial. Los procedimientos incluyen usar aparatos tales como la máquina de evolución Evolugator™ (Evolugate LLC, Gainesville, FL), fermentadores y similares. Adicionalmente, también puede emplearse fermentación en frascos de agitación y crecimiento en condiciones microaerobias. Dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente

documento los expertos en la técnica entenderán que los microorganismos que producen LCA acoplada al crecimiento pueden emplearse en una variedad de diferentes entornos en una variedad de diferentes condiciones usando una variedad de diferentes procedimientos y/o aparatos bien conocidos en la técnica.

5 Generalmente, la producción continua y/o casi continua de LCA incluirá cultivar un organismo que produce LCA acoplada al crecimiento que no se produce de manera natural de la divulgación en medio y nutrientes suficientes para sostener y/o casi sostener el crecimiento en una fase exponencial. El cultivo continuo en tales condiciones puede hacerse crecer, por ejemplo, durante un día, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o más. Adicionalmente, los cultivos continuos pueden incluir duraciones de tiempo de 1 semana, 2, 3, 4 o 5 o más semanas y hasta varios meses. Ha de entenderse que las condiciones de cultivo continuo y/o casi continuo pueden incluir todos los intervalos de tiempo entre estos periodos a modo de ejemplo. En divulgaciones particulares el cultivo se realiza en un medio de cultivo sustancialmente anaerobio.

15 Puede recogerse o aislarse LCA en cualquier punto de tiempo durante el periodo de cultivo continuo y/o casi continuo ejemplificado anteriormente. Tal como se ejemplifica a continuación, cuanto más tiempo se mantengan los microorganismos en una fase de crecimiento continuo y/o casi continuo, proporcionalmente más cantidad de LCA puede producirse.

20 Por tanto, la divulgación proporciona un método para producir LCA que incluye cultivar un organismo microbiano que no se produce de manera natural que incluye una o más alteraciones génicas. Las alteraciones pueden producirse en genes que codifican una enzima para acoplar la producción de LCA al crecimiento del microorganismo cuando la alteración génica reduce una actividad de la enzima, de manera que las alteraciones confieren producción acoplada al crecimiento estable de LCA en el organismo microbiano que no se produce de manera natural.

25 En algunas divulgaciones la alteración génica puede incluir una delección génica completa. En algunas divulgaciones otros medios para alterar un gen incluyen, por ejemplo, desplazamiento del marco por omisión o adición de oligonucleótidos o por mutaciones que hacen al gen inoperable. Un experto en la técnica reconocerá las ventajas de las delecciones génicas, sin embargo, debido a la estabilidad que pueden conferir al organismo que no se produce de manera natural frente a la reversión a su tipo natural. En particular, las alteraciones génicas se seleccionan del conjunto de genes que incluyen genes detallados anteriormente en el presente documento.

35 Las estrategias de ingeniería metabólica enumeradas en esta divulgación suponen que el organismo puede producir alcoholes de cadena larga por medio de la ruta independiente de malonil-CoA. La construcción de un organismo huésped recombinante capaz de producir alcoholes de cadena larga por medio de la ruta independiente de malonil-CoA implica modificar por ingeniería genética un organismo microbiano que no se produce de manera natural que tiene una ruta de síntesis de ácidos grasos (FAS) independiente de malonil-CoA y una ruta de reducción de acilos que tiene al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una enzima de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA expresada en cantidades suficientes para producir un alcohol primario. Una ruta de FAS independiente de malonil-CoA de este tipo incluye una cetoacil-CoA aciltransferasa o cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa. La ruta de reducción de acilos incluye una acil-CoA reductasa y una alcohol deshidrogenasa.

45 Con el fin de validar las predicciones computacionales presentadas en el presente documento, las cepas deben construirse, evolucionar y someterse a prueba. *Escherichia coli* K-12 MG1655 que alberga la ruta de MI-LCA servirá como cepa en la que se introducirán las alteraciones. Las alteraciones se construirán incorporando delecciones en marco usando recombinación homóloga por medio del sistema de recombinasa λ Red de Datsenko y Wanner (Datsenko, K.A. y B.L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. 97(12): p. 6640-5.). El enfoque implica reemplazar una secuencia cromosómica (es decir, el gen seleccionado como diana para su eliminación) por un gen de resistencia a antibiótico seleccionable, el cual se elimina posteriormente. Se integran las desactivaciones una a una en la cepa receptora. No permanece ningún marcador de resistencia a antibiótico tras cada delección, permitiendo la acumulación de múltiples mutaciones en cada cepa diana. La tecnología de delección elimina completamente el gen seleccionado como diana para su eliminación para reducir sustancialmente la posibilidad de que los mutantes contruidos reviertan de nuevo al tipo natural.

55 A medida que se construyen cepas intermedias, se cuantificará el rendimiento de las cepas realizando fermentaciones en frascos de agitación. Se obtendrán condiciones anaerobias sellando los frascos con un tampón de caucho y luego rociando el medio con nitrógeno. Para cepas en las que no se observa crecimiento en condiciones anaerobias estrictas, pueden aplicarse condiciones microaerobias cubriendo el frasco con papel de aluminio y perforando un pequeño orificio para lograr una aireación limitadas. Todos los experimentos se realizan usando medio mínimo M9 complementado con glucosa a menos que se establezca otra cosa. Los cultivos previos se hacen crecer durante la noche y se usan como inóculo para un cultivo discontinuo nuevo para el que se toman mediciones durante el crecimiento exponencial. La velocidad de crecimiento se determina midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la velocidad de captación de glucosa monitorizando el agotamiento de la fuente de carbono a lo largo del tiempo. Se analizan LCA, etanol y ácidos orgánicos mediante CG-EM o HPLC usando procedimientos de rutina. Se hacen crecer cultivos por triplicado para cada cepa.

El rendimiento de cepas seleccionadas se somete a prueba en fermentaciones discontinuas anaerobias, de pH controlado. Esto permite una cuantificación fiable del crecimiento, la captación de glucosa y las velocidades de formación de todos los productos, así como garantiza que la acumulación de productos de fermentación ácidos no limitará el crecimiento celular. Además, permite la determinación precisa del rendimiento y la productividad volumétrica de LCA, dos parámetros importantes en la evaluación comparativa del rendimiento de cepas. Las fermentaciones se llevan a cabo en biorreactores de 1 l con 600 ml de volumen de trabajo, equipados con control de temperatura y pH. El reactor se rocía de manera continua con N₂ a aproximadamente 0,5 l/min para garantizar que los niveles de DO permanecen por debajo de los niveles de detección. El medio de cultivo es el mismo que se describió anteriormente, excepto porque se aumenta la concentración de glucosa según la densidad celular superior que puede lograrse en un recipiente de fermentación.

Se realizarán experimentos de quimiostato para obtener una medida directa de cómo el cambio en el modo de fermentación desde discontinuo a continuo afecta a la productividad volumétrica y rendimiento de LCA. Los biorreactores descritos anteriormente que usan el modo discontinuo se hacen funcionar en el modo de quimiostato a través del suministro continuo de medio y la eliminación del cultivo gastado. La velocidad de flujo de entrada se fija para mantener una velocidad de dilución constante del 80 % de la velocidad de crecimiento máxima observada para cada cepa en el cultivo discontinuo, y el flujo de salida se controla para mantener el nivel. La glucosa es el nutriente limitante en el medio, y se fija para lograr la densidad óptica deseada en el recipiente.

Inicialmente se espera que las cepas recombinantes presenten velocidades de crecimiento subóptimas hasta que sus redes metabólicas se hayan ajustado a sus funcionalidades ausentes. Para permitir este ajuste, las cepas evolucionan de manera adaptativa. Al someter a las cepas a evolución adaptativa, la velocidad de crecimiento celular se convierte en la presión de selección primaria y se fuerza a las células mutantes a redistribuir sus flujos metabólicos con el fin de potenciar sus velocidades de crecimiento. Esta reprogramación del metabolismo se ha demostrado recientemente para varios mutantes de *E. coli* que habían evolucionado de manera adaptativa sobre diversos sustratos hasta alcanzar las velocidades de crecimiento predichas *a priori* mediante un modelo *in silico* (Fong, S.S. y B.O. Palsson, Metabolic gene-deletion strains of *Escherichia coli* evolve to computationally predicted growth phenotypes. Nat Genet, 2004. 36(10): p. 1056-8.). Las cepas generadas por OptKnock evolucionan de manera adaptativa por triplicado (discurriendo en paralelo) debido a diferencias en los patrones evolutivos evidenciados previamente en *E. coli* (Fong, S.S. y B.O. Palsson, Metabolic gene-deletion strains of *Escherichia coli* evolve to computationally predicted growth phenotypes. Nat Genet, 2004. 36(10): p. 1056-8; Fong, S.S., J.Y. Marciniak, y B.O. Palsson, Description and interpretation of adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 by using a genome-scale *in silico* metabolic model. J Bacteriol, 2003. 185(21): p. 6400-8; Ibarra, R.U., J.S. Edwards, y B.O. Palsson, *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve *in silico* predicted optimal growth. Nature, 2002. 420(6912): p. 186-189) que podrían dar como resultado posiblemente una cepa que tuviera cualidades de producción superiores con respecto a las otras. Se ejecutan las evoluciones durante un periodo de 2-6 semanas, dependiendo de la mejora en la velocidad de crecimiento lograda. En general, las evoluciones se detienen una vez que se obtiene un fenotipo estable. El concepto de producción bioquímica acoplada al crecimiento detrás del enfoque de OptKnock da como resultado la generación de sobreproductores genéticamente estables.

Las cepas modificadas por ingeniería genética pueden caracterizarse midiendo la velocidad de crecimiento, la velocidad de captación de sustrato y la velocidad de secreción de productos/subproductos. Los cultivos se hacen crecer durante la noche y se usan como inóculo para un cultivo discontinuo nuevo para el que se toman mediciones durante el crecimiento exponencial. La velocidad de crecimiento puede determinarse midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (A600). Se determinan las concentraciones de glucosa y otros subproductos de ácidos orgánicos en el sobrenadante de cultivo mediante HPLC usando una columna HPX-87H (BioRad), y se usan para calcular las velocidades de captación y secreción. Todos los experimentos se realizan con cultivos por triplicado.

Tras el procedimiento de evolución adaptativa, las nuevas cepas se caracterizan otra vez midiendo la velocidad de crecimiento, la velocidad de captación de sustrato y la velocidad de secreción de productos/subproductos. Estos resultados se comparan con las predicciones de OptKnock representando gráficamente los rendimientos de producción y crecimiento reales junto a las envueltas de producción. Se eligen las combinaciones de evolución/diseño de OptKnock más satisfactorias para continuar adicionalmente, y se caracterizan en fermentaciones continuas y discontinuas a escala de laboratorio. El concepto de producción bioquímica acoplada al crecimiento detrás del enfoque de OptKnock debe dar como resultado también la generación de sobreproductores genéticamente estables. Por tanto, los cultivos se mantienen en modo continuo durante un mes para evaluar la estabilidad a largo plazo. Se tomarán muestras periódicas para garantizar que el rendimiento y la productividad se mantienen a lo largo de todo el experimento.

Tal como se mencionó anteriormente, un método computacional para identificar y diseñar alteraciones metabólicas que favorecen la biosíntesis de un producto deseado es el marco computacional OptKnock (Burgard *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 84:647-657 (2003)). El marco examina la red metabólica y/o bioquímica completa de un microorganismo con el fin de sugerir manipulaciones genéticas que fuerzan a que el producto bioquímico deseado se convierta en un subproducto del crecimiento celular. Acoplando la producción bioquímica con el crecimiento celular a través de delecciones génicas colocadas estratégicamente u otra alteración génica funcional, las presiones

de selección del crecimiento impuestas sobre las cepas modificadas por ingeniería genética tras largos periodos de tiempo de un biorreactor conducen a mejoras en el rendimiento como resultado de la producción bioquímica acoplada al crecimiento obligatoria. Por último, cuando se construyen delecciones génicas hay una posibilidad insignificante de que las cepas diseñadas reviertan a sus estados de tipo natural porque los genes seleccionados mediante OptKnock van a eliminarse completamente del genoma. Por tanto, esta metodología computacional puede usarse para identificar rutas alternativas que conducen a la biosíntesis de un producto deseado o 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.

Brevemente, OptKnock es un término usado en el presente documento para referirse a un método y sistema computacional para modelar el metabolismo celular. El programa OptKnock se refiere a un marco de modelos y métodos que incorporan restricciones particulares en modelo de análisis de equilibrio de flujo (FBA). Estas restricciones incluyen, por ejemplo, información cinética cualitativa, información reguladora cualitativa y/o datos de experimentos 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 flujo y posteriormente explorando los límites de rendimiento de redes metabólicas en presencia de adiciones o alteraciones génicas. El marco computacional de OptKnock permite la construcción de formulaciones de modelos que permiten una consulta eficaz de los límites de rendimiento de redes metabólicas y proporciona métodos para solucionar los problemas de programación entera mixta resultantes. El modelado metabólico y los métodos de simulación a los que se hace referencia en el presente documento como OptKnock se describen en, por ejemplo, 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 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 modelado metabólico y sistema de simulación denominado SimFeny®. Este método y sistema computacional se describe en, por ejemplo, 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 el 13 de junio 2003. SimFeny® 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 contiene todas y cada una de las posibles funcionalidades de las reacciones químicas en el sistema, determinado de ese modo una gama de actividades permitidas para el sistema biológico. Este enfoque se denomina modelado basado en restricciones porque el espacio de solución está definido por restricciones tales como la estequiometría conocida de las reacciones incluidas así como restricciones de capacidad y termodinámicas de la reacción asociadas con los flujos máximos a través de las reacciones. El espacio definido por estas restricciones puede consultarse para determinar las capacidades fenotípicas y el comportamiento del sistema biológico o de sus componentes bioquímicos.

Estos enfoques computacionales son consecuentes con las realidades biológicas porque los sistemas biológicos son flexibles y pueden alcanzar el mismo resultado de muchos modos diferentes. Los sistemas biológicos están diseñados a través de mecanismos evolutivos que se han restringido mediante restricciones fundamentales que todos los sistemas vivos deben afrontar. Por tanto, la estrategia de modelado basado en restricciones abarca estas utilidades generales. Además, la capacidad para imponer de manera continua restricciones adicionales sobre un modelo de red por medio del estrechamiento de las restricciones da como resultado una reducción en el tamaño del espacio de solución, potenciando de ese modo la precisión con la que el fenotipo o rendimiento fisiológico puede predecirse.

Dadas las enseñanzas y guía proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica serán capaces de aplicar diversos marcos computacionales para el modelado metabólico y la simulación para diseñar e implementar la biosíntesis de un compuesto deseado en organismos microbianos huésped. Tales métodos de modelado metabólico y simulación incluyen, por ejemplo, los sistemas computacionales ejemplificados anteriormente como SimFeny® y OptKnock. Para ilustración de la divulgación, algunos métodos se describen en el presente documento con referencia al marco de computación 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 y marcos computacionales de modelado metabólico y simulación bien conocidos en la técnica.

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

Una vez identificado, el conjunto de reacciones que van a alterarse con el fin de lograr la producción de un producto deseado se implementan en la célula u organismo diana mediante alteración funcional de al menos un gen que codifica 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 una delección menos que 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 condujeran a conjuntos adicionales de reacciones a alterar o modificaciones metabólicas que puedan dar como resultado biosíntesis, incluyendo biosíntesis acoplada al crecimiento de un producto deseado, puede implementarse un método de optimización, denominado cortes enteros. Este método se realiza solucionando de manera iterativa el problema de OptKnock ejemplificado anteriormente con la incorporación de una restricción adicional denominada corte entero en cada iteración. Las restricciones de corte entero impiden eficazmente que el procedimiento de solución elija el mismo conjunto exacto de reacciones identificadas en cualquier iteración previa que acopla obligatoriamente la biosíntesis de productos al crecimiento. Por ejemplo, si una modificación metabólica acoplada al crecimiento identificada anteriormente especifica las reacciones 1, 2 y 3 para la alteración, entonces la siguiente restricción impide que las mismas reacciones se consideren simultáneamente en soluciones posteriores. El método de cortes enteros se conoce bien en la técnica y puede encontrarse descrito en, por ejemplo, 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 el marco computacional OptKnock para modelado metabólico y simulación, el método de cortes enteros de reducción de la redundancia en análisis computacional iterativo también puede aplicarse con otros marcos computacionales bien conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, SimFeny®.

Los métodos ejemplificados en el presente documento permiten la construcción de células y organismos que producen de manera biosintética un producto deseado, incluyendo el acoplamiento de la producción de un producto bioquímico diana al crecimiento de la célula o el organismo modificado 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 SimFeny®. El conjunto de modificaciones metabólicas puede incluir, por ejemplo, la adición de una o más enzimas de rutas de biosíntesis y/o la alteración funcional de una o más reacciones metabólicas incluyendo, por ejemplo, alteración mediante delección génica.

Tal como se comentó anteriormente, se desarrolló la metodología OptKnock con la premisa de que redes microbianas mutantes pueden evolucionar hacia sus fenotipos de crecimiento máximo predichos computacionalmente cuando se someten a largos periodos de selección de crecimiento. En otras palabras, el enfoque potencia la capacidad de un organismo para autooptimizarse bajo presiones selectivas. El marco de OptKnock permite la enumeración exhaustiva de combinaciones de alteraciones génicas que fuerzan al acoplamiento entre producción bioquímica y crecimiento celular basándose en la estequiometría de la red. La identificación de alteraciones de reacción/génicas 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 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* de metabolismo de *Escherichia coli* para identificar genes esenciales para rutas metabólicas tal como se ejemplificó anteriormente y se describió en, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y en la patente estadounidense n.º 7.127.379. Tal como se divulga en el presente documento, el marco matemático OptKnock puede aplicarse a alteraciones génicas precisa que conducen a la producción acoplada al crecimiento de un producto deseado. Además, la solución del problema de OptKnock de dos niveles proporciona solo un conjunto de alteraciones. Para enumerar todas las soluciones significativas, es decir, todos los conjuntos de alteraciones que conducen a la formación de producción acoplada al crecimiento, puede implementarse una técnica de optimización, denominada cortes enteros. Esto conlleva solucionar de manera iterativa el problema de OptKnock con la incorporación de una restricción adicional denominada corte entero a cada iteración, tal como se comentó anteriormente.

La evolución adaptativa es una técnica experimental poderosa que puede usarse para aumentar las velocidades de crecimiento de cepas microbianas mutantes o modificadas por ingeniería genética, o de cepas de tipo natural que crecen en condiciones ambientales no naturales. Es especialmente útil para cepas diseñadas por medio del formalismo OptKnock, que da como resultado formación de productos acoplada al crecimiento. Por tanto, la evolución hacia cepas de crecimiento óptimo optimizará indirectamente la producción también. Se crearon cepas únicas de *E. coli* K-12 MG1655 a través de desactivaciones génicas y evolución adaptativa. (Fong, S. S. y B. O. Palsson, Nat.Genet. 36:1056-1058 (2004).) En este trabajo, se mantuvieron todos los cultivos de evolución

adaptativa en crecimiento exponencial prolongado mediante pase en serie de cultivos discontinuos en medio nuevo antes de que se alcanzara la fase estacionaria, haciendo por tanto que la velocidad de crecimiento sea la presión de selección primaria. Los genes que se seleccionaron para este estudio de desactivación fueron *ackA*, *frdA*, *pckA*, *ppc*, *tpiA* y *zwf*. Se construyeron cepas deficientes y evolucionaron sobre medio mínimo complementado con diferentes sustratos de carbono (cuatro para cada cepa deficiente). Se llevaron a cabo cultivos de evolución por duplicado o triplicado, dando un total de 50 cepas deficientes de evolución.

Los cultivos de evolución se mantuvieron en crecimiento exponencial hasta que se alcanzó una velocidad de crecimiento estable. Las predicciones computacionales fueron precisas (es decir, dentro del 10 %) en la predicción de la velocidad de crecimiento tras la evolución de las cepas deficientes en 38 de los 50 casos examinados. Además, una combinación de diseño por OptKnock con evolución adaptativa ha conducido a cepas de producción de ácido láctico mejorada. (Fong, S. S., A. P. Burgard, C. D. Herring, E. M. Knight, F. R. Blattner, C. D. Maranas, y B. O. Palsson, *Biotechnol Bioeng* 91:643-648 (2005)). La guía de estas técnicas relevantes para *E. coli* pueden aplicarse a otros organismos.

Existen varias tecnologías desarrolladas para llevar a cabo evolución adaptativa. Se proporcionan métodos a modo de ejemplo a continuación en el presente documento. En algunas divulgaciones la optimización de un organismo que no se produce de manera natural de la presente divulgación incluye someterse al uso de cualquiera de estas técnicas de evolución adaptativa.

El cultivo en serie implica la transferencia repetitiva de un pequeño volumen cultivo hecho crecer en un recipiente mucho más grande que contiene medio de crecimiento nuevo. Cuando los organismos cultivados se han hecho crecer hasta la saturación en el nuevo recipiente, el proceso se repite. Este método se ha usado para lograr las demostraciones más prolongadas de cultivo sostenido en la bibliografía (Lenski, R. E. y M. Travisano, *Proc Natl Acad Sci U S.A.* 91:6808-6814 (1994)) en experimentos que demostraron claramente la mejora constante en la velocidad de reproducción a lo largo de un periodo de años. En los experimentos realizados en el laboratorio de Palsson descritos anteriormente, la transferencia se realiza habitualmente durante la fase exponencial, de modo que cada día se calcula de manera precisa el volumen de transferencia para mantener el crecimiento exponencial a lo largo de siguiente periodo de 24 horas. Este proceso se realiza habitualmente de manera manual, con considerable inversión laboral, y puede verse sometido a contaminación a través de la exposición al entorno exterior. Además, puesto que se transfieren tales pequeños volúmenes cada vez, la evolución es ineficaz y se pierden muchas mutaciones beneficiosas. Por el lado positivo, la dilución en serie es barata y fácil de paralelizar.

En cultivo continuo, el crecimiento de células en un quimiostato representa un caso extremo de dilución en el que una fracción muy alta de la población celular permanece. A medida que el cultivo crece y se satura, una pequeña proporción del cultivo hecho crecer se reemplaza por medio nuevo, permitiendo que el cultivo crezca de manera continua hasta casi su tamaño de población máximo. Se han usado quimiostatos para demostrar periodos cortos de mejora rápida en la velocidad de reproducción (Dykhuizen, D. E., *Methods Enzymol.* 613-631 (1993)). El poder potencial de estos dispositivos se reconoció, pero los quimiostatos tradicionales eran incapaces de sostener largos periodos de selección para lograr una velocidad de reproducción aumentada, debido a la selección no deseada de variantes resistentes a la dilución (estáticas). Estas variantes son capaces de resistir la dilución adhiriéndose a la superficie del quimiostato, y al hacer esto, desplazan a individuos menos pegajosos incluyendo los que tienen velocidades de reproducción incluso superiores, obviando por tanto el propósito previsto del dispositivo. (Chao, L. y G. Ramsdell *J.Gen.Microbiol* 20:132-138 (1985)). Un posible modo para superar esta desventaja es la implementación de un dispositivo con dos cámaras de crecimiento, que experimentan periódicamente fases transitorias de esterilización, tal como se describe en la patente del Instituto Pasteur (Marliere y Mutzel, patente estadounidense 6.686.194, presentada en 1999).

Evolugator™ es un dispositivo de cultivo continuo desarrollado por Evolugate, LLC (Gainesville, FL) que presenta ahorros de tiempo y esfuerzo significativos con respecto a las técnicas de evolución tradicionales (de Crecy, E., Metzgar, D., Allen, C., Penicaud, M., Lyons, B., Hansen, C.J., de Crecy-Lagard, V. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:489-496 (2007)). Las células se mantienen en crecimiento exponencial prolongado mediante el pase en serie de cultivos discontinuos en medio nuevo antes de que se logre la fase estacionaria. Al automatizar la medición de la densidad óptica y la manipulación de líquidos, el instrumento Evolugator puede realizar la transferencia en serie a altas velocidades usando grandes volúmenes de cultivo, aproximándose así a la eficacia de un quimiostato para la evolución de la aptitud de las células. Por ejemplo, un mutante de *Acinetobacter* sp ADP1 deficiente en un componente del aparato de traducción, y que tenía un crecimiento gravemente dificultado, evolucionó en 200 generaciones hasta el 80 % de la velocidad de crecimiento de tipo natural. Sin embargo, en contraposición al quimiostato que mantiene las células en un único recipiente, la máquina funciona desplazándose desde un "reactor" hasta el siguiente en regiones subdivididas de un carrito de tubos, eliminando por tanto cualquier selección de crecimiento en la pared. El volumen de transferencia puede ajustarse, y normalmente fijarse a aproximadamente el 50 %.

EJEMPLO I

Biosíntesis de alcoholes primarios

Este ejemplo describe la generación de un organismo microbiano capaz de producir alcoholes primarios usando una ruta metabólica de FAS independiente de malonil-CoA y rutas metabólicas de reducción de acilos.

Se usa *Escherichia coli* como organismo diana para diseñar por ingeniería genética una ruta de reducción de acilos y FAS independiente de malonil-CoA tal como se muestra en la figura 1. *E. coli* proporciona un buen huésped para generar un microorganismo que no se produce de manera natural capaz de producir alcohol primario, tal como octanol. *E. coli* es propenso a manipulación genética y se sabe que es capaz de producir diversos productos, como etanol, eficazmente en condiciones anaerobias.

Para generar una cepa de *E. coli* modificada por ingeniería genética para producir alcohol primario, se expresan en *E. coli* ácidos nucleicos que codifican las enzimas utilizadas en la ruta de reducción de acilos y FAS independiente de malonil-CoA tal como se describió anteriormente, usando técnicas de biología molecular bien conocidas (véanse, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente, 2001; Ausubel citado anteriormente, 1999; Roberts *et al.*, citado anteriormente, 1989). En particular, los genes *fadI/fadJ* (NP_416844.1 y NP_416843.1), que codifican el complejo multienzimático con actividades cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa en condiciones anaerobias, y el TDE0597 (NP_971211.1), que codifica enoil-CoA reductasa, se clonan en el vector pZE13 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. El gen *acr1* (YP_047869.1), que codifica acil-CoA reductasa, y el gen *alrA* (BAB12273.1), que codifica alcohol deshidrogenasa, se clonan en el vector pZA33 (Expressys, Ruelzheim, Alemania) bajo el promotor PA1/lacO. Los dos conjuntos de plásmidos se transforman en la cepa de *E. coli* MG1655 para expresar las proteínas y enzimas requeridas para la ruta de reducción de acilos y FAS independiente de malonil-CoA.

El organismo modificado por ingeniería genética resultante se cultiva en medio que contiene glucosa siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente, 2001). La expresión de la ruta de reducción de acilos y FAS independiente de malonil-CoA genes se corrobora usando métodos bien conocidos en la técnica para determinar la expresión de polipéptidos o actividad enzimática, incluyendo, por ejemplo, transferencias de tipo Northern, amplificación por PCR de ARNm, inmunotransferencia. Se confirman las actividades enzimáticas de las enzimas expresadas usando ensayos específicos para las actividades individuales (véanse, por ejemplo, Tucci, citado anteriormente, 2007; Hoffmeister *et al.*, 2005; Inui *et al.*, citado anteriormente, 1984; Winkler, 2003; Tani, 2000; Reiser, 1997; Ishige, 2000). La capacidad de la cepa de *E. coli* modificada por ingeniería genética para producir alcohol primario, tal como octanol, se confirma usando HPLC, cromatografía de gases-espectrometría de masas (CGEM) o cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CLEM).

Las cepas microbianas se modificaron por ingeniería genética para tener una ruta de reducción de acilos y FAS independiente de malonil-CoA funcional y se aumentó adicionalmente mediante optimización para una utilización eficaz de la ruta. Brevemente, la cepa modificada por ingeniería genética se evalúa para determinar si cualquiera de los genes exógenos se expresan a un nivel limitante de la velocidad. Se aumenta la expresión para cualquier enzima expresada a bajos niveles que pueden limitar el flujo a través de la ruta mediante, por ejemplo, introducción de números de copias adicionales del gen.

Para generar mejores productores, se utiliza modelado metabólico para optimizar las condiciones de crecimiento. Se usa también modelado para diseñar desactivaciones de genes que optimizan adicionalmente la utilización de la ruta (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense US 2002/0012939, US 2003/0224363, US 2004/0029149, US 2004/0072723, US 2003/0059792, US 2002/0168654 y US 2004/0009466, y en la patente estadounidense n.º 7.127.379). El análisis de modelado permite predicciones fiables de los efectos sobre el crecimiento celular de la desviación del metabolismo hacia una producción más eficaz de alcoholes primarios. Un método de modelado es el enfoque de optimización de dos niveles, OptKnock (Burgard *et al.*, Biotechnol. Bioengineer. 84:647-657 (2003)), que se aplica para seleccionar desactivaciones de genes que conjuntamente dan como resultado una mejor producción de alcoholes primarios. También puede usarse evolución adaptativa para generar mejores productores de, por ejemplo, el producto intermedio acetil-CoA o el producto de alcohol primario. La evolución adaptativa se realiza para mejorar tanto las características de crecimiento como las de producción (Fong y Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058 (2004); Alper *et al.*, Science 314:1565-1568 (2006)). Basándose en los resultados, pueden aplicarse rondas posteriores de modelado, ingeniería genética y evolución adaptativa al producto de alcohol primario para aumentar adicionalmente su producción.

Para la producción a gran escala de alcoholes primarios, el organismo que contiene la ruta de FAS independiente de malonil-CoA anterior se cultiva en un fermentador usando un medio conocido en la técnica para soportar el crecimiento del organismo en condiciones anaerobias. Las fermentaciones se realizan de una manera o bien discontinua, de alimentación discontinua o bien continua. Se mantienen las condiciones anaerobias rociando en primer lugar el medio con nitrógeno y luego sellando el recipiente de cultivo (por ejemplo, los frascos pueden sellarse con un tapón y una cápsula engarzada). También pueden utilizarse condiciones microanaerobias proporcionando un pequeño orificio para una aireación limitada. El pH del medio se mantiene a un pH de 7 mediante la adición de un ácido, tal como H₂SO₄. Se determina la velocidad de crecimiento midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (600 nm), y la velocidad de captación de glucosa monitorizando el agotamiento de la fuente de

carbono a lo largo del tiempo. Subproductos tales como alcoholes, ácidos orgánicos y glucosa residual no deseados pueden cuantificarse mediante HPLC (Shimadzu) con una columna HPX-087 (BioRad), usando un detector de índice de refracción para glucosa y alcoholes, y un detector de UV para ácidos orgánicos, Lin *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 775-779 (2005).

El aislamiento del producto alcohol primario se realiza basándose en su insolubilidad en agua. En particular, se usa un proceso de fermentación de dos fases para la separación de estos alcoholes producto en donde o bien pueden formar una fase separada o bien pueden extraerse fácilmente de una fase orgánica del caldo de fermentación. Se eliminan células residuales y cualquier otra impureza insoluble mediante filtración, lo que permite un proceso de fermentación continuo o semicontinuo.

EJEMPLO II

Microorganismos que tienen producción de LCA acoplada al crecimiento

Este ejemplo describe la construcción *in silico* de cepas diseñadas para la producción de LCA acoplada al crecimiento.

E. coli K-12 MG1655 sirve como cepa de tipo natural en la que se introducen las alteraciones. Las alteraciones se construyen incorporando delecciones en marco usando recombinación homóloga por medio del sistema de recombinasa λ Red de Datsenko y Wanner. (Datsenko, K.A. y B.L. Wanner, Proc Natl Acad Sci USA., 97(12):6640-5 (2000)). El enfoque implica reemplazar una secuencia cromosómica (es decir, el gen seleccionado como diana para su eliminación) por un gen de resistencia a antibiótico seleccionable, el cual se elimina posteriormente. Se integran las desactivaciones una a una en la cepa receptora. No permanecerá ningún marcador de resistencia a antibiótico tras cada delección, permitiendo la acumulación de múltiples mutaciones en cada cepa diana. La tecnología de delección elimina completamente el gen seleccionado como diana para su eliminación para reducir sustancialmente la posibilidad de que los mutantes construidos reviertan de nuevo al tipo natural.

Tal como se describe adicionalmente a continuación, una condición de crecimiento a modo de ejemplo para lograr la biosíntesis de LCA incluye condiciones de cultivo o fermentación anaerobias. El organismo microbiano que no se produce de manera natural de la divulgación puede sostenerse, cultivarse o fermentarse en condiciones anaerobias o sustancialmente anaerobias. Brevemente, condiciones anaerobias se refiere a un entorno carente de oxígeno. Las condiciones sustancialmente anaerobias incluyen, por ejemplo, un cultivo, fermentación discontinua o fermentación continua tal que la concentración de oxígeno disuelto en el medio permanece entre el 0 y el 10 % de saturación. Las condiciones sustancialmente anaerobias también incluyen el crecimiento o reposo de las células en medio líquido o sobre agar sólido dentro de una cámara sellada mantenida con una atmósfera de menos del 1 % de oxígeno. El porcentaje de oxígeno puede mantenerse, por ejemplo, rociando el cultivo con una mezcla de N_2/CO_2 u otro gas o gases distintos de oxígeno adecuados.

Las cepas modificadas por ingeniería genética se caracterizan mediante la medición de la velocidad de crecimiento, la velocidad de captación de sustrato y la velocidad de secreción de productos/subproductos. Los cultivos se hacen crecer durante la noche y se usan como inóculo para un cultivo discontinuo nuevo para el que se toman mediciones durante el crecimiento exponencial. Se determina la velocidad de crecimiento midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (A600). Se determinan las concentraciones de glucosa, LCA y otros subproductos de ácidos orgánicos en el sobrenadante de cultivo mediante HPLC usando una columna HPX-87H (BioRad), y se usan para calcular las velocidades de captación y secreción. Se realizan todos los experimentos con cultivos por triplicado.

Las cepas recombinantes pueden presentar velocidades de crecimiento subóptimas hasta que sus redes metabólicas se ajusten a sus funcionalidades ausentes. Para permitir este ajuste, las cepas evolucionan de manera adaptativa. Al someter las cepas a evolución adaptativa, la velocidad de crecimiento celular se convierte en la presión de selección principal y se fuerza a las células mutantes a redistribuir sus flujos metabólicos con el fin de potenciar sus velocidades de crecimiento. Esta reprogramación del metabolismo se ha demostrado recientemente para varios mutantes de *E. coli* que habían evolucionado de manera adaptativa sobre diversos sustratos hasta alcanzar las velocidades de crecimiento predichas *a priori* mediante un modelo *in silico*. (Fong, S.S. y B.O. Palsson, Nat Genet, 36(10):1056-8 (2004)). Estas enseñanzas pueden aplicarse a *Escherichia coli*.

Si se demuestra que las predicciones de OptKnock son satisfactorias; las mejoras del crecimiento ocasionadas por la evolución adaptativa irán acompañadas por velocidades potenciadas de producción de LCA. Las cepas generadas por OptKnock evolucionaron de manera adaptativa por triplicado (discurriendo en paralelo) debido a diferencias en los patrones evolutivos evidenciados anteriormente en *E. coli* (Fong, S.S. y B.O. Palsson, Nat Genet, 36(10):1056-8 (2004); Fong, S.S., J.Y. Marciniak, y B.O. Palsson, J Bacteriol, 185(21):6400-8 (2003); Ibarra, R.U., J.S. Edwards, y B.O. Palsson, Nature, 420(6912): 186-189 (2002)) que podrían dar como resultado posiblemente una cepa que tuviera cualidades de producción superiores con respecto a las otras. Se ejecutan las evoluciones durante un periodo de 2-6 semanas, dependiendo de la mejora en la velocidad de crecimiento lograda. En general, las evoluciones se detienen una vez que se obtiene un fenotipo estable.

El procedimiento de evolución adaptativa implica mantener las células en crecimiento exponencial prolongado mediante el pase en serie de cultivos discontinuos en medio nuevo antes de que se logre la fase estacionaria. Brevemente, un procedimiento permite que las células alcancen crecimiento exponencial medio ($A_{600} = 0,5$) antes de diluirse y pasarse a medio nuevo (es decir, medio mínimo M9 con 2 g/l de fuente de carbono). Se repite este procedimiento, permitiendo aproximadamente 500 generaciones para cada cultivo. Se toman muestras de cultivo, se congelan con nitrógeno líquido y se registra la densidad óptica del cultivo cada día a lo largo del transcurso de las evoluciones. Se realizan las evoluciones por triplicado debido a diferencias en los patrones evolutivos evidenciados previamente por Donnelly *et al.*, Appl Biochem Biotechnol 70-72: 187-98 (1998); Vemuri *et al.*, Appl Environ Microbiol 68:1715-27 (2002), que podrían dar como resultado potencialmente una cepa que tuviera cualidades de producción superiores con respecto a las otras. La etapa de evolución adaptativa puede durar hasta aproximadamente dos meses o más. La etapa de evolución adaptativa también puede ser de menos de dos meses dependiendo del diseño de cepa, por ejemplo.

Otro procedimiento puede hacer evolucionar células usando tecnología de automatización y está disponible comercialmente de Evolugate, LLC (Gainesville, FL) con un contrato de servicio. El procedimiento emplea la máquina de evolución Evolugator™ que da como resultado ahorros de tiempo y esfuerzo significativos con respecto a las técnicas de evolución no automatizadas. Las células se mantienen en crecimiento exponencial prolongado mediante el pase en serie de cultivos discontinuos en medio nuevo antes de que se logre la fase estacionaria. Al automatizar la medición de la densidad óptica y la manipulación de líquidos, el instrumento Evolugator puede realizar la transferencia en serie a altas velocidades usando grandes volúmenes de cultivo, aproximándose así a la eficacia de un quimiostato para la evolución de la aptitud de las células. Por ejemplo, un mutante de *Acinetobacter* sp ADP1 deficiente en un componente del aparato de traducción, y que tenía un crecimiento gravemente dificultado, evolucionó en 200 generaciones hasta el 80 % de la velocidad de crecimiento de tipo natural. Sin embargo, en contraposición al quimiostato que mantiene las células en un único recipiente, la máquina funciona desplazándose desde un “reactor” hasta el siguiente en regiones subdivididas de un carrete de tubos, eliminando por tanto cualquier selección de crecimiento en la pared. El volumen de transferencia puede ajustarse, y normalmente fijarse a aproximadamente el 50 %.

En contraposición a un quimiostato, que mantiene las células en un único recipiente, la máquina funciona desplazándose desde un “reactor” hasta el siguiente en regiones subdivididas de un carrete de tubos, eliminando por tanto cualquier selección de crecimiento en la pared. Se toman muestras de cultivo, se congelan con nitrógeno líquido y se registra la densidad óptica del cultivo cada día a lo largo del transcurso de las evoluciones. Se usa el instrumento Evolugator para cada cepa hasta que se logra una velocidad de crecimiento estable. Se han observado mejoras en la velocidad de crecimiento de casi el 50 % en dos semanas usando este dispositivo. Las cepas descritas anteriormente evolucionan de manera adaptativa por triplicado (discurriendo en paralelo). A intervalos de diez días, se toman muestras de cultivo del Evolugator, se purifican sobre placas de agar y se cultivan por triplicado tal como se comentó anteriormente para evaluar la fisiología de la cepa. Evolugator™ es un dispositivo de cultivo continuo que presenta ahorros de tiempo y esfuerzo significativos con respecto a las técnicas de evolución tradicionales. (de Crecy *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:489-496 (2007)).

Tras el procedimiento de evolución adaptativa, las nuevas cepas se caracterizan otra vez midiendo la velocidad de crecimiento, la velocidad de captación de sustrato y la velocidad de secreción de productos/subproductos. Estos resultados se comparan con las predicciones de OptKnock representando gráficamente los rendimientos de producción y crecimiento reales junto a las envueltas de producción. Se eligen las combinaciones de evolución/diseño de OptKnock más satisfactorias para continuar adicionalmente, y se caracterizan en fermentaciones continuas y discontinuas a escala de laboratorio. El concepto de producción bioquímica acoplada al crecimiento detrás del enfoque de OptKnock debe dar como resultado también la generación de sobreproductores genéticamente estables. Por tanto, los cultivos pueden mantenerse en modo continuo durante un mes para evaluar la estabilidad a largo plazo. Se tomarán muestras periódicas para garantizar que el rendimiento y la productividad se mantienen a lo largo de todo el experimento.

EJEMPLO III

Microorganismos que tienen producción de LCA acoplada al crecimiento

Este ejemplo describe la construcción de cepas diseñadas *in silico* para la producción de LCA acoplada al crecimiento.

Se introducen delecciones génicas en *S. cerevisiae* mediante recombinación homóloga del gen interrumpido por el casete KanMX, flanqueado por sitios loxP que permiten la eliminación y el reciclaje del marcador de resistencia (por ejemplo URA3) (Wach, A., *et al.*, PCR-based gene targeting in *Saccharomyces cerevisiae*, en Yeast Gene Analysis, M.F. Tuite, Editor. 1998, Academic Press: San Diego). Partiendo de una secuencia de loxP-kanMX-loxP en un plásmido, se crea un constructo artificial con esta secuencia flanqueada por fragmentos del gen de interés mediante PCR usando cebadores que contienen ambas secuencias diana de 45-50 pb seguidas por una región homóloga al casete anterior. Este ADN lineal se transforma en *S. cerevisiae* de tipo natural, y se seleccionan recombinantes mediante resistencia a genética (Wach, A., *et al.* citado anteriormente). Se purifican las colonias y se someten a

prueba para determinar el cruzamiento doble correcto mediante PCR. Para eliminar el marcador KanMX, se introduce un plásmido que contiene la recombinasa Cre y resistencia a bleomicina, que promueve la recombinación entre los sitios loxP (Gueldener, U., *et al.*, Nucleic Acids Res. e23 (2002)). Finalmente, se cura la cepa resultante del plásmido Cre mediante cultivo sucesivo en medios sin ningún antibiótico presente. La cepa final tendrá una delección génica sin marcador, y por tanto puede usarse el mismo método para introducir múltiples delecciones en la misma cepa.

Las cepas se construyen, evolucionan y se someten a prueba mediante métodos divulgados en el presente documento. Pueden insertarse genes en *S. cerevisiae*, por ejemplo, usando varios métodos. Estos métodos pueden basarse en plásmidos mientras que otros permiten la incorporación del gen en el cromosoma. Este último enfoque emplea un vector de expresión basado en promotor integrador, por ejemplo, el vector pGAPZ o el pGAPZ α basado en el promotor GAP. El vector de expresión constituye el promotor GAP, el alelo de tipo natural HIS4 para la integración y la región de terminación de la transcripción AOX en 3' de *P. pastoris* además de un casete KanMX, flanqueado por sitios loxP que permiten la eliminación y el reciclaje del marcador de resistencia. Ambos de estos vectores están disponibles comercialmente de Invitrogen (Carlsbad, CA).

El método conlleva la síntesis y amplificación del gen de interés con cebadores adecuados, seguido por la digestión del gen en un sitio de restricción único, tal como el creado por las enzimas *EcoRI/XhoI* (Vellanki *et al.*, Biotechnol. Lett. 29:313-318 (2007)). El gen se inserta en los sitios *EcoRI* y *XhoI* en el vector de expresión, en el sentido de 3' del promotor GAP. La inserción génica se verifica mediante PCR y/o análisis de la secuencia de ADN. El plásmido recombinante se linealiza entonces con *NarI* para la integración de histidina, se purifica y se integra en el ADN cromosómico de *S. cerevisiae* usando un método de transformación apropiado. Las células se siembran en placa en el medio YPD con el marcador de selección apropiado (por ejemplo, kanamicina) y se incuban durante 2-3 días. Entonces se analizarán los transformantes para detectar el inserto génico requerido mediante PCR de colonias.

Para eliminar el marcador antibiótico, se introduce un plásmido que contiene la recombinasa Cre, que promueve recombinación entre los sitios loxP (Gueldener *et al.*, citado anteriormente). Finalmente, se cura la cepa resultante del plásmido Cre mediante cultivo sucesivo en medios sin ningún antibiótico presente. La cepa final tendrá una delección génica sin marcador, y por tanto puede usarse el mismo método para introducir múltiples inserciones en la misma cepa.

Las cepas modificadas por ingeniería genética se caracterizan mediante la medición de la velocidad de crecimiento, la velocidad de captación de sustrato y la velocidad de secreción de productos/subproductos. Se hacen crecer los cultivos durante la noche y se usan como inóculo para un cultivo discontinuo nuevo para el que se toman mediciones durante el crecimiento exponencial. Se determina la velocidad de crecimiento midiendo la densidad óptica usando un espectrofotómetro (A600). Se determinan las concentraciones de glucosa, alcoholes y otros subproductos de ácidos orgánicos en el sobrenadante de cultivo mediante métodos analíticos incluyendo HPLC usando una columna HPX-87H (BioRad), o CG-EM, y se usan para calcular las velocidades de captación y secreción. Se realizan todos los experimentos con cultivos por triplicado.

Se anticipa inicialmente que las cepas deficientes presentan velocidades de crecimiento subóptimas hasta que sus redes metabólicas han ajustado sus funcionalidades ausentes. Para permitir este ajuste, las cepas evolucionarán de manera adaptativa. Al someter las cepas a evolución adaptativa, la velocidad de crecimiento celular se convierte en la presión de selección principal y se forzará a las células mutantes a redistribuir sus flujos metabólicos con el fin de potenciar sus velocidades de crecimiento. Esta reprogramación del metabolismo se ha demostrado recientemente para varios mutantes de *E. coli* que habían evolucionado de manera adaptativa sobre diversos sustratos hasta alcanzar las velocidades de crecimiento predichas *a priori* mediante un modelo *in silico*. Las mejoras en el crecimiento ocasionadas por evolución adaptativa pueden ir acompañadas por velocidades potenciadas de producción de LCA. Las cepas generadas por OptKnock pueden evolucionar de manera adaptativa pos triplicado (discurriendo en paralelo) debido a diferencias en los patrones evolutivos evidenciados en *E. coli* que podrían dar como resultado posiblemente una cepa que tuviera cualidades de producción superiores con respecto a las otras. Las evoluciones pueden ejecutarse durante un periodo de 2-6 semanas, o más dependiendo de la mejora en la velocidad de crecimiento lograda. En general, las evoluciones pueden detenerse una vez que se obtiene un fenotipo estable.

El procedimiento de evolución adaptativa implica mantener las células en crecimiento exponencial prolongado mediante el pase en serie de cultivos discontinuos en medio nuevo antes de que se logre la fase estacionaria. Brevemente, un procedimiento permite que las células alcancen crecimiento exponencial medio ($A_{600}=0,5$) antes de diluirse y pasarse a medio nuevo (es decir, medio mínimo M9 con 2 g/l de fuente de carbono). Se repite este procedimiento, permitiendo aproximadamente 500 generaciones para cada cultivo. Se toman muestras de cultivo, se congelan con nitrógeno líquido y se registra la densidad óptica del cultivo cada día a lo largo del transcurso de las evoluciones. Se realizan las evoluciones por triplicado debido a diferencias en los patrones evolutivos evidenciados previamente por Donnelly *et al.*, Appl Biochem Biotechnol 70-72: 187-98 (1998); Vemuri *et al.*, Appl Environ Microbiol 68:1715-27 (2002), que podrían dar como resultado potencialmente una cepa que tuviera cualidades de producción superiores con respecto a las otras. La etapa de evolución adaptativa puede durar hasta aproximadamente dos meses o más. La etapa de evolución adaptativa también puede ser de menos de dos meses dependiendo del diseño

de cepa, por ejemplo.

Otro procedimiento puede hacer evolucionar células usando tecnología de automatización y está disponible comercialmente de Evolugate, LLC (Gainesville, FL) con un contrato de servicio. El procedimiento emplea la máquina de evolución Evolugator™ que da como resultado ahorros de tiempo y esfuerzo significativos con respecto a las técnicas de evolución no automatizadas. Las células se mantienen en crecimiento exponencial prolongado mediante el pase en serie de cultivos discontinuos en medio nuevo antes de que se logre la fase estacionaria. Al automatizar la medición de la densidad óptica y la manipulación de líquidos, el instrumento Evolugator puede realizar la transferencia en serie a altas velocidades usando grandes volúmenes de cultivo, aproximándose así a la eficacia de un quimiostato para la evolución de la aptitud de las células²⁵. En contraposición a un quimiostato que mantiene las células en un único recipiente, la máquina funciona desplazándose desde un “reactor” hasta el siguiente en regiones subdivididas de un carrito de tubos, eliminando por tanto cualquier selección de crecimiento en la pared. Se toman muestras de cultivo, se congelan con nitrógeno líquido y se registra la densidad óptica del cultivo cada día a lo largo del transcurso de las evoluciones. Se usa el instrumento Evolugator para cada cepa hasta que se logra una velocidad de crecimiento estable. Se han observado mejoras en la velocidad de crecimiento de casi el 50 % en dos semanas usando este dispositivo. Las cepas descritas anteriormente evolucionan de manera adaptativa por triplicado (discurriendo en paralelo). A intervalos de diez días, se toman muestras de cultivo del Evolugator, se purifican sobre placas de agar y se cultivan por triplicado tal como se comentó anteriormente para evaluar la fisiología de la cepa.

Tras el procedimiento de evolución adaptativa, las nuevas cepas se caracterizan otra vez midiendo la velocidad de crecimiento, la velocidad de captación de sustrato y la velocidad de secreción de productos/subproductos. Estos resultados se comparan con las predicciones de OptKnock representando gráficamente los rendimientos de producción y crecimiento reales junto a las envueltas de producción. Se eligen las combinaciones de evolución/diseño de OptKnock más satisfactorias para continuar adicionalmente, y se caracterizan en fermentaciones continuas y discontinuas a escala de laboratorio. El concepto de producción bioquímica acoplada al crecimiento detrás del enfoque de OptKnock debe dar como resultado también la generación de sobreproductores genéticamente estables. Por tanto, los cultivos pueden mantenerse en modo continuo durante un mes para evaluar la estabilidad a largo plazo. Se tomarán muestras periódicas para garantizar que el rendimiento y la productividad se mantienen a lo largo de todo el experimento.

Se describió anteriormente en el presente documento la aplicación de la metodología OptKnock para generar dianas de alteración génica útiles. Se enumeraron múltiples estrategias de alteración para establecer el acoplamiento entre producción de LCA y crecimiento de *Escherichia coli*. Esta metodología puede aplicarse a una amplia variedad de células y microorganismos distintos de *Escherichia coli* y también puede utilizar modelado metabólico y sistemas de simulación distintos de OptKnock.

La plataforma de modificación por ingeniería genética y computacional combinada descrita en el presente documento puede aplicarse generalmente a cualquier organismo modelo estequiométrico y las enseñanzas y orientación proporcionadas en el presente documento permitirán a los expertos en la técnica diseñar e implementar conjuntos de manipulaciones genéticas para alteraciones metabólicas que conducen a la producción acoplada al crecimiento de cualquier producto bioquímico.

La presente divulgación proporciona estrategias de alteración génica para la producción de LCA acoplada al crecimiento en *Escherichia coli* en condiciones anaerobias. Las estrategias sugeridas pueden aumentar los rendimientos de productos significativamente con respecto a los rendimientos notificados para cada uno de estos productos. En la tabla 1 se enumera una lista exhaustiva de las estrategias para la producción de LCA. En la tabla 2 se catalogan los genes asociados y las estequiometrías para cada una de las alteraciones de la reacción. La tabla 3 enumera abreviaturas de metabolitos y sus correspondientes números junto con su ubicación.

Tabla 1: La lista de todas las estrategias de alteración identificadas por OptKnock que lo más probablemente proporcionan producción de LCA acoplada al crecimiento.

1	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	PGDHY	PYK	DHAPT
2	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	PGL	PYK	DHAPT
3	ADHEr	LDH_D	ASPT	G6PDHy	MDH	PFLi	PYK	DHAPT
4	ADHEr	LDH_D	ASPT	EDA	MDH	PFLi	PYK	DHAPT
5	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGDH	PGI	PTAr	
6	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGDH	PGI	
7	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	PTAr	TAL	
8	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	PTAr	TKT1	
9	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGI	TKT1	
10	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGI	TAL	

ES 2 703 775 T3

11	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	PTAr		
12	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	TPI		
13	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	TPI		
14	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	PTAr		
15	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	GLCpts	GLUDy		
16	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PFK		
17	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGI	RPE	
18	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	PTAr	RPE	
19	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	PTAr	TKT2	
20	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGI	TKT2	
21	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGDH	PGI		
22	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGDH	PGI	PTAr		
23	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGI	TKT1		
24	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGI	TAL		
25	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	PTAr	TAL		
26	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	PTAr	TKT1		
27	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PFK			
28	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TPI			
29	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	GLCpts			
30	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	PTAr			
31	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	PTAr			
32	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TPI			
33	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGI	RPE		
34	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	PTAr	RPE		
35	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFLi	PGI	
36	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGI	TKT2		
37	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	PTAr	TKT2		
38	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFLi	TPI	
39	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFLi	
40	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFK	PFLi	
41	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6	PGI	
42	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6	PGI	
43	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6	PFK	
44	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	FUM	NADH6	
45	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6	TPI	
46	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6	TPI	
47	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	MDH	NADH6	
48	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6	PFK	
49	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	GLUDy	PFLi	PGI	
50	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	MDH	PFLi	PGI	
51	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	PGI	SUCD4		
52	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFLi	PGI		
53	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFLi	PGI		
54	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGDH	PGI	
55	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGDH	PGI	PTAr	
56	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	GLUDy	PFK	PFLi	
57	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLCpts	GLUDy	PFLi	
58	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	MDH	PFK	PFLi	
59	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	GLUDy	PFLi	TPI	
60	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	MDH	PFLi	
61	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	MDH	PFLi	TPI	
62	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFLi	TPI		
63	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFLi	TPI		

ES 2 703 775 T3

64	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	GLCpts	PFLi	
65	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	NADH6	PFLi	
66	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	PFLi	SUCD4	
67	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFK	PFLi	
68	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	SUCD4	TPI	
69	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	PFLi	SUCD4	
70	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFK	PFLi	
71	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLCpts	MDH	PFLi	PGI
72	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLCpts	PFLi	PGI
73	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PGI	PPS
74	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PGI	PPS
75	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGI	PTAr	TAL
76	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGI	TAL
77	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGI	TKT1
78	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGI	PTAr	TKT1
79	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	TPI	
80	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PFK	
81	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PTAr	TPI	
82	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PFK	PTAr	
83	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	GLUDy	HEX1	
84	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	PTAr	
85	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLCpts	MDH	PFLi	TPI
86	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	GLCpts	MDH	PFLi
87	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLCpts	MDH	PFK	PFLi
88	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLCpts	PFK	PFLi
89	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLCpts	PFLi	TPI
90	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	FUM	GLCpts	PFLi
91	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGI	PTAr	RPE
92	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGI	RPE
93	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	PGI
94	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	PGI
95	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	MDH	PPS
96	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PFK	PPS
97	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PFK	PPS
98	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PPS	TPI
99	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PPS	TPI
100	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	FUM	PPS
101	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	HEX1	PGI	TKT2
102	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PGI	PTAr	TKT2
103	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	FUM	GLUDy
104	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	PFK
105	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	GLUDy	MDH
106	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	TPI
107	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	PFK
108	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	TPI
109	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGDH	PGI	
110	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGDH	PGI	PTAr	
111	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGI	TAL	
112	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	PTAr	TKT1	
113	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGI	TKT1	
114	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	PTAr	TAL	
115	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TPI		
116	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	PTAr		

ES 2 703 775 T3

117	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	PTAr			
118	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	GLUDy			
119	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PfK			
120	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TPI			
121	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGI	RPE		
122	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	PTAr	RPE		
123	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	PTAr	TKT2		
124	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGI	TKT2		
125	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGDH	PGI	PTAr		
126	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGDH	PGI		
127	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	PGI	
128	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	MDH	PGI	
129	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	PTAr	TAL		
130	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	PTAr	TKT1		
131	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGI	TKT1		
132	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGI	TAL		
133	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PFLi	PGI	SUCD4	
134	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	HEX1	PFLi	PGI	
135	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	NADH6	PFLi	PGI	
136	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA	HEX1			
137	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	PTAr			
138	ADHEr	LDH_D	HEX1	PfK	PTAr			
139	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PfK			
140	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	TPI			
141	ADHEr	LDH_D	HEX1	PTAr	TPI			
142	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	PTAr	RPE		
143	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGI	RPE		
144	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FBA	FUM	
145	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FBA	MDH	
146	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	MDH	TPI	
147	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	PfK	
148	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	TPI	
149	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	MDH	PfK	
150	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	NADH6	PFLi	
151	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	NADH6	PfK	PFLi	
152	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	PFLi	SUCD4	
153	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	HEX1	PfK	PFLi	
154	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PfK	PFLi	SUCD4	
155	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	NADH6	PFLi	TPI	
156	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	GLUDy	HEX1	PFLi	
157	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	PFLi	SUCD4	TPI	
158	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	HEX1	PFLi	TPI	
159	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	MDH	PFLi	PGI	
160	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	HEX1	PFLi	PGI	
161	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	PTAr	TKT2		
162	ADHEr	LDH_D	ACKr	HEX1	PGI	TKT2		
163	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	MDH	PfK	
164	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	HEX1	MDH	
165	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	MDH	TPI	
166	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	FUM	GLUDy	HEX1	
167	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	HEX1	PfK	
168	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	HEX1	TPI	
169	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLUDy	HEX1	PFLi	

ES 2 703 775 T3

170	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	HEX1	PFLi	TPI
171	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	MDH	PFLi	TPI
172	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	MDH	PFK	PFLi
173	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	MDH	PFLi
174	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	HEX1	PFK	PFLi
175	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	HEX1	PGI
176	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	MDH	PGI
177	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PGI	
178	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PGI	
179	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6	PGI
180	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6	PGI
181	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGDH	PGI
182	ADHEr	LDH_D	PGDH	PGI	PTAr		
183	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGDH	PGI		
184	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PFLi	PGI
185	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	TPI	
186	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	TPI	
187	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	PFK	
188	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	FUM	
189	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FBA	MDH	
190	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PFK	
191	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGI	TKT1		
192	ADHEr	LDH_D	PGI	PTAr	TAL		
193	ADHEr	LDH_D	PGI	PTAr	TKT1		
194	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGI	TAL		
195	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	MDH	NADH6
196	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6	PFK
197	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6	TPI
198	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6	TPI
199	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6	PFK
200	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	FUM	GLUDy	NADH6
201	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI	TAL
202	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI	TKT1
203	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PFK	
204	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	TPI	
205	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	HEX1	
206	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	PYK	SUCD4	
207	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PYK	SUCD4	
208	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PTAr	PYK	
209	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	GLUDy	PYK	
210	ADHEr	LDH_D	FDH2	GLUDy	NADH6	PTAr	PYK
211	ADHEr	LDH_D	ACKr	FDH2	GLUDy	NADH6	PYK
212	ADHEr	LDH_D	PFK	PTAr			
213	ADHEr	LDH_D	ACKr	TPI			
214	ADHEr	LDH_D	ACKr	FBA			
215	ADHEr	LDH_D	PTAr	TPI			
216	ADHEr	LDH_D	FBA	PTAr			
217	ADHEr	LDH_D	ACKr	PFK			
218	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi	PGI	
219	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGI	PROIz	SUCD4
220	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGI	RPE		
221	ADHEr	LDH_D	PGI	PTAr	RPE		
222	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGI	TKT2		

ES 2 703 775 T3

223	ADHEr	LDH_D	PGI	PTAr	TKT2		
224	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI	RPE
225	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi	TPI	
226	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFK	PFLi	
227	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	GLUDy	PFLi	
228	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	PFLi	PROIz	SUCD4
229	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PROIz	SUCD4	TPI
230	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	PFLi	PROIz	SUCD4
231	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	PGI	SUCD4
232	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi	PGI
233	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi	PGI
234	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	PGI	SUCD4
235	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFLi	PGI
236	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFLi	PGI
237	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI	TKT2
238	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFK	PFLi	SUCD4
239	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFK	PFLi
240	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	SUCD4	TPI
241	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFK	PFLi
242	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLUDy	PFLi	SUCD4
243	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	SUCD4	TPI
244	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFK	PFLi	SUCD4
245	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi
246	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	MDH	PFLi	SUCD4
247	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi
248	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi	TPI
249	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi	TPI
250	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6	PYK
251	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6	PYK
252	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFLi	PGI	PTAr
253	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PFLi	PGI
254	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	GLUDy	MDH	PFLi
255	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFK	PFLi
256	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	FUM	GLUDy	PFLi
257	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFLi	TPI
258	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFLi	TPI
259	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFK	PFLi
260	ADHEr	LDH_D	ME2	PGL	PTAr	PYK	SUCD4
261	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	ME2	PTAr	PYK
262	ADHEr	LDH_D	ACKr	ME2	PGL	PYK	SUCD4
263	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	ME2	PGL	PYK
264	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PGL	PTAr	PYK
265	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	ME2	PTAr	PYK	SUCD4
266	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	G6PDHy	ME2	PYK
267	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	ME2	PYK	SUCD4
268	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	PTAr	PYK	SUCD4
269	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	MDH	NADH6	PYK
270	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	MDH	PTAr	PYK
271	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PGL	PTAr	PYK
272	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	MDH	PYK	SUCD4
273	ADHEr	LDH_D	ACKr	MDH	PGL	PYK	SUCD4
274	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PGL	PTAr	PYK
275	ADHEr	LDH_D	ACKr	MDH	NADH6	PGL	PYK

ES 2 703 775 T3

276	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	G6PDHy	MDH	PYK
277	ADHEr	LDH_D	MDH	PGL	PTAr	PYK	SUCD4
278	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	MDH	PGL	PYK
279	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	NADH6	PTAr	PYK
280	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PGI	
281	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PTAr	PYK	
282	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	MDH	PYK	
283	ADHEr	LDH_D	ACKr	FUM	GLUDy	PYK	
284	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PTAr	PYK	
285	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGDH	PGI	
286	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	TPI	
287	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PFK	
288	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	NADH6	
289	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFLi	PGI		
290	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	PYK
291	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	PYK
292	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	TKT1	
293	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	TAL	
294	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PFK		
295	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	HEX1		
296	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	TPI		
297	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFLi	TPI		
298	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	PFLi		
299	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	PFLi		
300	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	RPE	
301	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	NADH6	PGI	PYK
302	ADHEr	LDH_D	GLUDy	NADH6	PGI	PTAr	PYK
303	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	TKT2	
304	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	PYK		
305	ADHEr	LDH_D	ACKr	PYK	SUCD4		
306	ADHEr	LDH_D	FRD2	PTAr	PYK		
307	ADHEr	LDH_D	PTAr	PYK	SUCD4		
308	ADHEr	LDH_D	ACKr	FDH2	NADH6	PYK	
309	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PTAr	PYK	
310	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PGI		
311	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PFLi	PGI	
312	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	PGI	PTAr	
313	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi	PYK	
314	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	PGDH	PGI
315	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	PGDH	PGI
316	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	PGI	
317	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	PGI	
318	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	NADH6		
319	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PFK		
320	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	TPI		
321	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	FUM	GLUDy	
322	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	PFK	
323	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FBA	GLUDy	MDH	
324	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	TPI	
325	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	TPI	
326	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	PFK	
327	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	ME2	PFLi	PYK
328	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PFLi	PGL	PYK

ES 2 703 775 T3

329	ADHEr	LDH_D	EDA	FRD2	ME2	PFLi	PYK
330	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PFLi	PGDHY	PYK
331	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFK	PFLi	
332	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	MDH	PFLi	
333	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	TPI	
334	ADHEr	LDH_D	FBA	FUM	GLUDy	PFLi	
335	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	TPI	
336	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFK	PFLi	
337	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGI	SUCD4		
338	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi	PGI		
339	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi	PGI		
340	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PFLi	PGL	PYK
341	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	MDH	PFLi	PYK
342	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PFLi	PGDHY	PYK
343	ADHEr	LDH_D	EDA	FRD2	MDH	PFLi	PYK
344	ADHEr	LDH_D	ACKr	ASPT	MDH	PYK	
345	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PTAr	PYK	
346	ADHEr	LDH_D	ACKr	ASPT	FUM	PYK	
347	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PTAr	PYK	
348	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	PGI	
349	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	PGI	
350	ADHEr	LDH_D	FBA	PFLi	SUCD4		
351	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFK	PFLi		
352	ADHEr	LDH_D	PFLi	SUCD4	TPI		
353	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	PFLi		
354	ADHEr	LDH_D	PFK	PFLi	SUCD4		
355	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi	TPI		
356	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi	TPI		
357	ADHEr	LDH_D	FBA	NADH6	PFLi		
358	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFK	PFLi		
359	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	PGI	
360	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi	PGI	
361	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFLi	PYK
362	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFLi	PYK
363	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	PYK
364	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	TPI	
365	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi	TPI	
366	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	MDH	PFLi	
367	ADHEr	LDH_D	ASPT	FBA	FUM	PFLi	
368	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFK	PFLi	
369	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFK	PFLi	
370	ADHEr	LDH_D	ACKr	NADH6	PGI	PYK	
371	ADHEr	LDH_D	NADH6	PGI	PTAr	PYK	
372	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	PYK	
373	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MALS	MDH	PYK
374	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	ICL	MDH	PYK
375	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGDH	PGI	
376	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	PGI	
377	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	PFLi		
378	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	TPI		
379	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	PFLi		
380	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGI	TAL	
381	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGI	TKT1	

ES 2 703 775 T3

382	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PRO1z	PYK	SUCD4
383	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi	PYK
384	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	PYK	SUCD4
385	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	PYK	SUCD4
386	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi	PYK
387	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PGI		
388	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	PFLi	PYK	SUCD4
389	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	PGDHY	PYK	SUCD4
390	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	PGL	PYK	SUCD4
391	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	PFLi	PYK	SUCD4
392	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6	PYK
393	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6	PYK
394	ADHEr	LDH_D	ACKr	AKGD	ATPS4r	GLUDy	PYK
395	ADHEr	LDH_D	AKGD	ATPS4r	GLUDy	PTAr	PYK
396	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi	PYK		
397	ADHEr	LDH_D	ALAR	PFLi	PRO1z	PYK	SUCD4
398	ADHEr	LDH_D	DAAD	PFLi	PRO1z	PYK	SUCD4
399	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGDH	PGI		
400	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	PGI		
401	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	PFLi	PYK
402	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	PFLi	PYK
403	ADHEr	LDH_D	PFLi	TPI			
404	ADHEr	LDH_D	FBA	PFLi			
405	ADHEr	LDH_D	PFK	PFLi			
406	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi	PYK	
407	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	PYK	
408	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGI	TKT1		
409	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGI	TAL		
410	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	NADH6
411	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	NADH6
412	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	ME2	PFLi	PYK	SUCD4
413	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	PFLi	PYK	SUCD4
414	ADHEr	LDH_D	ME2	PFLi	PGDHY	PYK	SUCD4
415	ADHEr	LDH_D	ME2	PFLi	PGL	PYK	SUCD4
416	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PFLi	PGDHY	PYK
417	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	NADH6	PFLi	PYK
418	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	NADH6	PFLi	PYK
419	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PFLi	PGL	PYK
420	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	MDH	NADH6
421	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	CBMK2	FUM	NADH6
422	ADHEr	LDH_D	CBMK2	PFLi	PGI	RPE	
423	ADHEr	LDH_D	ASNS2	GLU5K	PFLi	PGI	RPE
424	ADHEr	LDH_D	ASNS2	G5SD	PFLi	PGI	RPE
425	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	PTAr
426	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	PTAr
427	ADHEr	LDH_D	PFLi	PGI			
428	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	GLUDy	
429	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	GLUDy	MDH	
430	ADHEr	LDH_D	ACKr	AKGD	ATPS4r	PYK	
431	ADHEr	LDH_D	AKGD	ATPS4r	PTAr	PYK	
432	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	NADH6	
433	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	NADH6	
434	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLCpts	GLUDy	PTAr	

ES 2 703 775 T3

435	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGL
436	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGDH	PTAr
437	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGL	PTAr
438	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLCpts	GLUDy
439	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	PGDH
440	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	TKT1
441	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	TAL
442	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	TKT1
443	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	TAL
444	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	RPE
445	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	RPE
446	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	TKT2
447	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	TKT2
448	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGDH	PTAr	THD2
449	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLCpts	PTAr	THD2
450	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLCpts	THD2
451	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGL	THD2
452	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGDH	THD2
453	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGL	PTAr	THD2
454	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	THD2	TKT1
455	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TAL	THD2
456	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TAL	THD2
457	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	THD2	TKT1
458	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	MDH	
459	ADHEr	LDH_D	ASPT	ATPS4r	FUM	
460	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	RPE	THD2
461	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	RPE	THD2
462	ADHEr	LDH_D	ACKr	ATPS4r	PYK	SUCOAS
463	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PTAr	PYK	SUCOAS
464	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	GLUDy	PFLi
465	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	THD2	TKT2
466	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	THD2	TKT2
467	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFLi	THD2
468	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGDH	THD2
469	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGL	PTAr	THD2
470	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLUDy	PTAr	THD2
471	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGDH	PTAr	THD2
472	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGL	THD2
473	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLUDy	THD2
474	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi	THD2
475	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	THD2	TKT1
476	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TAL	THD2
477	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TAL	THD2
478	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	THD2	TKT1
479	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGDH	
480	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	PGL	
481	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGDH	PTAr	
482	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGL	PTAr	
483	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLCpts	
484	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLCpts	PTAr	
485	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	RPE	THD2
486	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	RPE	THD2
487	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PTAr	

ES 2 703 775 T3

488	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	GLUDy	
489	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TKT1	
490	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TAL	
491	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TAL	
492	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TKT1	
493	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi	PTAr	PYK
494	ADHEr	LDH_D	ACKr	NADH6	PFLi	PYK
495	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	THD2	TKT2
496	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	THD2	TKT2
497	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	RPE	
498	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	RPE	
499	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts	TKT2	
500	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr	TKT2	
501	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGDH	
502	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGL	PTAr	
503	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	PGL	
504	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	GLUDy	
505	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGDH	PTAr	
506	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	GLUDy	PTAr	
507	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TKT1	
508	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TKT1	
509	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TAL	
510	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TAL	
511	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	RPE	
512	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	RPE	
513	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr	TKT2	
514	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy	TKT2	
515	ADHEr	LDH_D	PGDH	PTAr	THD2	
516	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGDH	THD2	
517	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	PTAr	THD2	
518	ADHEr	LDH_D	PGL	PTAr	THD2	
519	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGL	THD2	
520	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy	THD2	
521	ADHEr	LDH_D	PTAr	TAL	THD2	
522	ADHEr	LDH_D	ACKr	THD2	TKT1	
523	ADHEr	LDH_D	ACKr	TAL	THD2	
524	ADHEr	LDH_D	PTAr	THD2	TKT1	
525	ADHEr	LDH_D	PTAr	RPE	THD2	
526	ADHEr	LDH_D	ACKr	RPE	THD2	
527	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PFLi	
528	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	PROIz	SUCD4
529	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLCpts	PFLi	
530	ADHEr	LDH_D	PTAr	THD2	TKT2	
531	ADHEr	LDH_D	ACKr	THD2	TKT2	
532	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLCpts		
533	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PTAr		
534	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi	THD2	
535	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	GLUDy	
536	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	MDH	
537	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	PFLi	SUCD4
538	ADHEr	LDH_D	GLCpts	MDH	PFLi	SUCD4
539	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	SUCD4
540	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	SUCD4

ES 2 703 775 T3

541	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PFLi
542	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PFLi
543	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	SUCD4	THD2
544	ADHEr	LDH_D	FUM	PFLi	SUCD4	THD2
545	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLCpts	PFLi
546	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLCpts	MDH	PFLi
547	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	GLUDy	PFLi
548	ADHEr	LDH_D	ASPT	GLUDy	MDH	PFLi
549	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	SUCD4	THD2
550	ADHEr	LDH_D	PGDH	PTAr		
551	ADHEr	LDH_D	PGL	PTAr		
552	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGL		
553	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	PTAr		
554	ADHEr	LDH_D	ACKr	G6PDHy		
555	ADHEr	LDH_D	ACKr	PGDH		
556	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi	THD2
557	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	THD2
558	ADHEr	LDH_D	ACKr	GLUDy		
559	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PTAr		
560	ADHEr	LDH_D	PTAr	TAL		
561	ADHEr	LDH_D	ACKr	TAL		
562	ADHEr	LDH_D	ACKr	TKT1		
563	ADHEr	LDH_D	PTAr	TKT1		
564	ADHEr	LDH_D	ACKr	RPE		
565	ADHEr	LDH_D	PTAr	RPE		
566	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFLi	SUCD4
567	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	GLUDy	PFLi
568	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	MDH	PFLi
569	ADHEr	LDH_D	ACKr	TKT2		
570	ADHEr	LDH_D	PTAr	TKT2		
571	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	SUCD4	THD2
572	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	THD2
573	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	THD2
574	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	NADH6	PFLi
575	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PFLi
576	ADHEr	LDH_D	GLCpts	MDH	PFLi	THD2
577	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	PFLi	THD2
578	ADHEr	LDH_D	ACKr	CBMK2	FRD2	PFLi
579	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FRD2	PFLi	PTAr
580	ADHEr	LDH_D	MDH	PTAr	SUCD4	
581	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PTAr	
582	ADHEr	LDH_D	ACKr	MDH	SUCD4	
583	ADHEr	LDH_D	ACKr	FRD2	MDH	
584	ADHEr	LDH_D	FDH2	MDH	NADH6	PTAr
585	ADHEr	LDH_D	ACKr	FDH2	MDH	NADH6
586	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFLi	THD2
587	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFLi	SUCD4	
588	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH12	NADH6	PFLi
589	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	PGL	
590	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	PGDH	
591	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	PGDH	
592	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	G6PDHy	
593	ADHEr	LDH_D	GLCpts	MDH	NADH6	PFLi

ES 2 703 775 T3

594	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	NADH6	PFLi
595	ADHEr	LDH_D	FRD2	PFLi		
596	ADHEr	LDH_D	ALAR	PFLi	PRO1z	SUCD4
597	ADHEr	LDH_D	DAAD	PFLi	PRO1z	SUCD4
598	ADHEr	LDH_D	ACKr			
599	ADHEr	LDH_D	PTAr			
600	ADHEr	LDH_D	FUM	PFLi	SUCD4	
601	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	SUCD4	
602	ADHEr	LDH_D	FUM	NADH12	NADH6	PFLi
603	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH12	NADH6	PFLi
604	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	TKT1	
605	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	TKT1	
606	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	TAL	
607	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	TAL	
608	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PFLi	PYK
609	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PFLi	
610	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PFLi	
611	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	RPE	
612	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	RPE	
613	ADHEr	LDH_D	PFLi	SUCD4	THD2	
614	ADHEr	LDH_D	NADH12	NADH6	PFLi	THD2
615	ADHEr	LDH_D	FUM	NADH6	PFLi	THD2
616	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PFLi	THD2
617	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	TKT2	
618	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	TKT2	
619	ADHEr	LDH_D	GLCpts	NADH6	PFLi	
620	ADHEr	LDH_D	GLUDy	NADH6	PFLi	THD2
621	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFLi	SUCD4	
622	ADHEr	LDH_D	GLUDy	NADH12	NADH6	PFLi
623	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PFLi	
624	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PFLi	
625	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	NADH6	
626	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	NADH6	
627	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	G6PDHy	GLUDy	NADH6
628	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PGDH
629	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	PGL
630	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	MDH	PFLi	THD2
631	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	FUM	PFLi	THD2
632	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	TKT1
633	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	TAL
634	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	THD2
635	ADHEr	LDH_D	GLCpts	MDH	PFLi	
636	ADHEr	LDH_D	FUM	GLCpts	PFLi	
637	ADHEr	LDH_D	GLUDy	NADH6	PFLi	
638	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	RPE
639	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	TKT2
640	ADHEr	LDH_D	FUM	PFLi	THD2	
641	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi	THD2	
642	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi	THD2	
643	ADHEr	LDH_D	PFLi	SUCD4		
644	ADHEr	LDH_D	NADH12	NADH6	PFLi	
645	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PFLi	
646	ADHEr	LDH_D	FUM	NADH6	PFLi	

ES 2 703 775 T3

647	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PFLi	
648	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PGL	
649	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	PGDH	
650	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	G6PDHy	NADH6	
651	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	TAL	
652	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	TKT1	
653	ADHEr	LDH_D	CBMK2	GLU5K	NADH6	PFLi
654	ADHEr	LDH_D	CBMK2	G5SD	NADH6	PFLi
655	ADHEr	LDH_D	ASNS2	CBMK2	NADH6	PFLi
656	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	THD2	
657	ADHEr	LDH_D	NADH6	PFLi		
658	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	RPE	
659	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6	TKT2	
660	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FUM	G5SD	PFLi
661	ADHEr	LDH_D	CBMK2	GLU5K	MDH	PFLi
662	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FUM	GLU5K	PFLi
663	ADHEr	LDH_D	CBMK2	G5SD	MDH	PFLi
664	ADHEr	LDH_D	ASNS2	CBMK2	FUM	PFLi
665	ADHEr	LDH_D	ASNS2	CBMK2	MDH	PFLi
666	ADHEr	LDH_D	MDH	PFLi		
667	ADHEr	LDH_D	FUM	PFLi		
668	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	RPE
669	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	TAL
670	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	TKT1
671	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	TKT2
672	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	PFLi	
673	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	NADH6	
674	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	RPE	
675	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	TAL	
676	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	TKT1	
677	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi	TKT2	
678	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	CBMK2	PFLi	
679	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	PFLi		
680	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PGDHY	PYK
681	ADHEr	LDH_D	ASPT	EDA	MDH	PYK
682	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	CBMK2	NADH6	
683	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	NADH6		
684	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	PPS
685	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	ME2	THD2	
686	ADHEr	LDH_D	ME2	PGL	THD2	
687	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDH	PGDHY	THD2
688	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	PGDH	THD2
689	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	TAL	THD2
690	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	TAL	THD2
691	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	THD2	TKT1
692	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	THD2	TKT1
693	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	RPE	THD2
694	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	RPE	THD2
695	ADHEr	LDH_D	MDH	PGL	THD2	
696	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	THD2	
697	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	PGDH	THD2
698	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDH	PGDHY	THD2
699	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	THD2	TKT2

ES 2 703 775 T3

700	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	THD2	TKT2
701	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	THD2	TKT1
702	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	THD2	TKT1
703	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	TAL	THD2
704	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	TAL	THD2
705	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	GLUDy	HEX1	PGI
706	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	RPE	THD2
707	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	RPE	THD2
708	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	THD2	TKT2
709	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	THD2	TKT2
710	ADHEr	LDH_D	ATPS4r	HEX1	PGI	
711	ADHEr	LDH_D	FRD2	HEX1	MDH	PGI
712	ADHEr	LDH_D	HEX1	MDH	PGI	SUCD4
713	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI	SUCOAS	
714	ADHEr	LDH_D	HEX1	MDH	NADH6	PGI
715	ADHEr	LDH_D	FUM	HEX1	NADH6	PGI
716	ADHEr	LDH_D	FRD2	FUM	HEX1	PGI
717	ADHEr	LDH_D	HEX1	PGI		
718	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	THD2		
719	ADHEr	LDH_D	THD2			
720	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TKT2	TPI
721	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	SUCOAS	TKT2
722	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	SUCOAS	TKT2
723	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TKT2	TPI
724	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	TKT2
725	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	TKT2
726	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI	SUCOAS	
727	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PGI	
728	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	RPE	SUCOAS
729	ADHEr	LDH_D	GLCpts	RPE	SUCOAS	TPI
730	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	RPE	SUCOAS
731	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	RPE	TPI
732	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	RPE
733	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	RPE
734	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	SUCOAS	TKT2
735	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	SUCOAS	TKT2
736	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TKT2	TPI
737	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	SUCOAS
738	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	TPI
739	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	SUCOAS
740	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	TKT2	
741	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	TKT2	
742	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TKT2	TPI	
743	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI	SUCOAS	
744	ADHEr	LDH_D	PGDHY	PGI		
745	ADHEr	LDH_D	EDA	PGI		
746	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PGI		
747	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	RPE	SUCOAS
748	ADHEr	LDH_D	GLUDy	RPE	SUCOAS	TPI
749	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	RPE	SUCOAS
750	ADHEr	LDH_D	GLCpts	RPE	TPI	
751	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	RPE	
752	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	RPE	

ES 2 703 775 T3

753	ADHEr	LDH_D	PFK	SUCOAS	TKT2	
754	ADHEr	LDH_D	FBA	SUCOAS	TKT2	
755	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	TKT2	TPI	
756	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TPI	
757	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK	SUCOAS	
758	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	SUCOAS	
759	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts	GLUDy	
760	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TPI	
761	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	PFK	
762	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	TKT2	
763	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	TKT2	
764	ADHEr	LDH_D	GLUDy	TKT2	TPI	
765	ADHEr	LDH_D	PGI	SUCOAS		
766	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PGI		
767	ADHEr	LDH_D	ASPT	G6PDHy	MDH	PYK
768	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PGL	PYK
769	ADHEr	LDH_D	FBA	RPE	SUCOAS	
770	ADHEr	LDH_D	PFK	RPE	SUCOAS	
771	ADHEr	LDH_D	RPE	SUCOAS	TPI	
772	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	SUCOAS	TKT1
773	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	SUCOAS	TAL
774	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	SUCOAS	TAL
775	ADHEr	LDH_D	HEX1	SUCOAS	TKT1	TPI
776	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	SUCOAS	TKT1
777	ADHEr	LDH_D	HEX1	SUCOAS	TAL	TPI
778	ADHEr	LDH_D	GLUDy	RPE	TPI	
779	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	RPE	
780	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	RPE	
781	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX1	TKT1	TPI
782	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX 1	PFK	TKT1
783	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	TKT1
784	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX 1	TAL	TPI
785	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	HEX1	TAL
786	ADHEr	LDH_D	GLUDy	HEX 1	PFK	TAL
787	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TPI	
788	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK	SUCOAS	
789	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy	SUCOAS	
790	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	SUCOAS	TKT2
791	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	SUCOAS	TKT2
792	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TPI		
793	ADHEr	LDH_D	GLCpts	PFK		
794	ADHEr	LDH_D	FBA	GLCpts		
795	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PYK	TKT2
796	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PYK	SUCD4	TKT2
797	ADHEr	LDH_D	PFK	TKT2		
798	ADHEr	LDH_D	FBA	TKT2		
799	ADHEr	LDH_D	TKT2	TPI		
800	ADHEr	LDH_D	CBMK2	SUCOAS	TAL	TPI
801	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	SUCOAS	TAL
802	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	SUCOAS	TKT1
803	ADHEr	LDH_D	CBMK2	PFK	SUCOAS	TAL
804	ADHEr	LDH_D	CBMK2	PFK	SUCOAS	TKT1
805	ADHEr	LDH_D	CBMK2	SUCOAS	TKT1	TPI

ES 2 703 775 T3

806	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	HEX1	SUCOAS
807	ADHEr	LDH_D	CBMK2	HEX1	SUCOAS	TPI
808	ADHEr	LDH_D	CBMK2	HEX1	PFK	SUCOAS
809	ADHEr	LDH_D	PGI			
810	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	TAL	
811	ADHEr	LDH_D	HEX1	TAL	TPI	
812	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	TAL	
813	ADHEr	LDH_D	HEX1	PFK	TKT1	
814	ADHEr	LDH_D	HEX1	TKT1	TPI	
815	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	TKT1	
816	ADHEr	LDH_D	PYK	RPE	SUCD4	SUCOAS
817	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	RPE	SUCOAS
818	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PYK	RPE
819	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PYK	RPE	SUCD4
820	ADHEr	LDH_D	RPE	TPI		
821	ADHEr	LDH_D	PFK	RPE		
822	ADHEr	LDH_D	FBA	RPE		
823	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	TPI		
824	ADHEr	LDH_D	PFK	SUCOAS		
825	ADHEr	LDH_D	FBA	SUCOAS		
826	ADHEr	LDH_D	GLUDy	TPI		
827	ADHEr	LDH_D	FBA	GLUDy		
828	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PFK		
829	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PYK	SUCOAS
830	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PYK	SUCD4	SUCOAS
831	ADHEr	LDH_D	HEX1	MDH	PFK	SUCD4
832	ADHEr	LDH_D	HEX1	MDH	SUCD4	TPI
833	ADHEr	LDH_D	FBA	HEX1	MDH	SUCD4
834	ADHEr	LDH_D	FRD2	HEX1	MDH	TPI
835	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	HEX1	MDH
836	ADHEr	LDH_D	FRD2	HEX1	MDH	PFK
837	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	TKT1	TPI
838	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	TAL	TPI
839	ADHEr	LDH_D	MDH	PFK	SUCD4	TKT1
840	ADHEr	LDH_D	MDH	PFK	SUCD4	TAL
841	ADHEr	LDH_D	FBA	MDH	SUCD4	TKT1
842	ADHEr	LDH_D	FBA	MDH	SUCD4	TAL
843	ADHEr	LDH_D	MDH	SUCD4	TAL	TPI
844	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PFK	TKT1
845	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PFK	TAL
846	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	MDH	TAL
847	ADHEr	LDH_D	MDH	SUCD4	TKT1	TPI
848	ADHEr	LDH_D	FBA	FRD2	MDH	TKT1
849	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	TKT2	
850	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	TKT2	
851	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	TKT2
852	ADHEr	LDH_D	CBMK2	PFK	TAL	
853	ADHEr	LDH_D	CBMK2	TAL	TPI	
854	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	TKT1	
855	ADHEr	LDH_D	CBMK2	TKT1	TPI	
856	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	TAL	
857	ADHEr	LDH_D	CBMK2	PFK	TKT1	
858	ADHEr	LDH_D	CBMK2	HEX1	PFK	

ES 2 703 775 T3

859	ADHEr	LDH_D	CBMK2	HEX1	TPI	
860	ADHEr	LDH_D	CBMK2	FBA	HEX1	
861	ADHEr	LDH_D	GLU5K	TAL	TPI	
862	ADHEr	LDH_D	G5SD	TAL	TPI	
863	ADHEr	LDH_D	FBA	GLU5K	TKT1	
864	ADHEr	LDH_D	G5SD	TKT1	TPI	
865	ADHEr	LDH_D	G5SD	PFK	TKT1	
866	ADHEr	LDH_D	GLU5K	PFK	TAL	
867	ADHEr	LDH_D	FBA	G5SD	TAL	
868	ADHEr	LDH_D	FBA	G5SD	TKT1	
869	ADHEr	LDH_D	G5SD	PFK	TAL	
870	ADHEr	LDH_D	GLU5K	TKT1	TPI	
871	ADHEr	LDH_D	GLU5K	PFK	TKT1	
872	ADHEr	LDH_D	FBA	GLU5K	TAL	
873	ADHEr	LDH_D	GLU5K	HEX1	TPI	
874	ADHEr	LDH_D	GLU5K	HEX1	PFK	
875	ADHEr	LDH_D	G5SD	HEX1	PFK	
876	ADHEr	LDH_D	FBA	G5SD	HEX1	
877	ADHEr	LDH_D	FBA	GLU5K	HEX1	
878	ADHEr	LDH_D	G5SD	HEX1	TPI	
879	ADHEr	LDH_D	ASNS2	PFK	TKT1	
880	ADHEr	LDH_D	ASNS2	TKT1	TPI	
881	ADHEr	LDH_D	ASNS2	PFK	TAL	
882	ADHEr	LDH_D	ASNS2	FBA	TKT1	
883	ADHEr	LDH_D	ASNS2	FBA	TAL	
884	ADHEr	LDH_D	ASNS2	TAL	TPI	
885	ADHEr	LDH_D	ASNS2	HEX1	PFK	
886	ADHEr	LDH_D	ASNS2	FBA	HEX1	
887	ADHEr	LDH_D	ASNS2	HEX1	TPI	
888	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	SUCOAS	TKT1
889	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	SUCOAS	TAL
890	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	SUCOAS	TAL
891	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	SUCOAS	TKT1
892	ADHEr	LDH_D	PYK	RPE	SUCD4	
893	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	RPE	
894	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	RPE
895	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PYK	TKT2
896	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PYK	TKT2
897	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	TKT2
898	ADHEr	LDH_D	GLUDy	PYK	SUCD4	
899	ADHEr	LDH_D	FRD2	GLUDy	PYK	
900	ADHEr	LDH_D	FDH2	GLUDy	NADH6	PYK
901	ADHEr	LDH_D	FBA			
902	ADHEr	LDH_D	TPI			
903	ADHEr	LDH_D	PFK			
904	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	SUCOAS	
905	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	SUCOAS	
906	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	SUCOAS
907	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PGDHY	PYK
908	ADHEr	LDH_D	EDA	FRD2	ME2	PYK
909	ADHEr	LDH_D	FRD2	ME2	PGL	PYK
910	ADHEr	LDH_D	EDA	ME2	PYK	SUCD4
911	ADHEr	LDH_D	ME2	PGDHY	PYK	SUCD4

ES 2 703 775 T3

912	ADHEr	LDH_D	ME2	PGL	PYK	SUCD4
913	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	ME2	PYK
914	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	ME2	PYK	SUCD4
915	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PGDHY	PYK
916	ADHEr	LDH_D	MDH	PGL	PYK	SUCD4
917	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PGL	PYK
918	ADHEr	LDH_D	FRD2	MDH	PGDHY	PYK
919	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	PYK	SUCD4
920	ADHEr	LDH_D	MDH	NADH6	PGL	PYK
921	ADHEr	LDH_D	EDA	FRD2	MDH	PYK
922	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	PYK	SUCD4
923	ADHEr	LDH_D	MDH	PGDHY	PYK	SUCD4
924	ADHEr	LDH_D	EDA	MDH	NADH6	PYK
925	ADHEr	LDH_D	FRD2	G6PDHy	MDH	PYK
926	ADHEr	LDH_D	G6PDHy	MDH	NADH6	PYK
927	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PYK	RPE
928	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PYK	RPE
929	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	TAL	
930	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	TKT1	
931	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4	TAL	
932	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK	TKT1	
933	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	TAL
934	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	TKT1
935	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	RPE	SUCOAS
936	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PYK	SUCOAS
937	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PYK	SUCOAS
938	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	NADH6	PYK
939	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	NADH6	PYK
940	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TKT2	
941	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TKT2	
942	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	TKT2
943	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	TKT2
944	ADHEr	LDH_D	FRD2	PYK		
945	ADHEr	LDH_D	PYK	SUCD4		
946	ADHEr	LDH_D	FDH2	NADH6	PYK	
947	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TKT2	
948	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	TAL
949	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	TKT1
950	ADHEr	LDH_D	FUM	GLUDy	PYK	
951	ADHEr	LDH_D	GLUDy	MDH	PYK	
952	ADHEr	LDH_D	GLCpts	RPE	SUCOAS	
953	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	RPE
954	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	RPE
955	ADHEr	LDH_D	GLUDy	RPE	SUCOAS	
956	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	RPE	
957	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	SUCOAS
958	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	SUCOAS
959	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	SUCOAS	PYK
960	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	NADH6	
961	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	NADH6	PYK
962	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	STKT2		
963	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TKT2		
964	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	TKT1

965	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	TAL
966	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	TAL
967	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	TKT1
968	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TAL	
969	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS	TKT1	
970	ADHEr	LDH_D	GLUDy	TKT2		
971	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TKT1	
972	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy	TAL	
973	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TKT1	
974	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS	TAL	
975	ADHEr	LDH_D	ASPT	MDH	PYK	
976	ADHEr	LDH_D	ASPT	FUM	PYK	
977	ADHEr	LDH_D	RPE	SUCOAS		
978	ADHEr	LDH_D	GLCpts	RPE		
979	ADHEr	LDH_D	GLCpts	SUCOAS		
980	ADHEr	LDH_D	GLUDy	RPE		
981	ADHEr	LDH_D	GLCpts	GLUDy		
982	ADHEr	LDH_D	GLUDy	SUCOAS		
983	ADHEr	LDH_D	TKT2			
984	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TAL		
985	ADHEr	LDH_D	GLCpts	TKT1		
986	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	TAL		
987	ADHEr	LDH_D	SUCOAS	TKT1		
988	ADHEr	LDH_D	GLUDy	TKT1		
989	ADHEr	LDH_D	GLUDy	TAL		
990	ADHEr	LDH_D	RPE			
991	ADHEr	LDH_D	GLCpts			
992	ADHEr	LDH_D	SUCOAS			
993	ADHEr	LDH_D	GLUDy			
994	ADHEr	LDH_D	TAL			
995	ADHEr	LDH_D	TKT1			

Tabla 2: Una lista de todas las estequiometrías de reacción y los genes asociados que se sabe que están asociados con las reacciones identificadas para la alteración en las estrategias enumeradas en las tablas 1.

Abreviatura de la reacción	Nombre de la reacción	Estequiometría de la reacción	Genes asignados
ACKr	acetato cinasa	[c] : ac + atp <==> actp+ adp	b2296, b3115
ADHEr	acetaldehído-CoA deshidrogenasa	[c] : accoa + (2) h + (2) nadh <==> coa + etoh + (2) nad	b1241
AKGD	2-oxoglutarato deshidrogenasa	[c] : akg + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	b0727, b0726, b0116
ALAR	alanina racemasa	[c] : ala-L <==> ala-D	b4053
ASNS2	asparagina sintetasa	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	L-aspartasa	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139
ATPS4r	ATP sintasa (cuatro protones para un ATP)	adp[c] + (4) h[e] + pi[c] <==> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	b3738+b3736+b3737, b3739, b3734+b3732+b3735+b3733+b3731
CBMK2	Carbamato cinasa	[c] : atp + co2 + nh4 --> adp + cbp + (2) h	b0323, b0521, b2874
DAAD	D-Aminoácido deshidrogenasa	[c] : ala-D + fad + h2o --> fadh2 + nh4 + pyr	b1189
EDA	2-deshidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolasa	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850

FBA	fructosa-bisfosfato aldolasa	[c] : fdp <==> dhap + g3p	b1773, b2097, b2925
FDH2	formiato deshidrogenasa (quinona-8: 2 protones)	for[c] + (3) h[c] + ubq8[c]--> co2[c] + h[e] + ubq8h2[c]	b3893+b3894+b3892, b1476+b1475+b1474, b4079
FRD2	fumarato reductasa	[c] : fum + mql8 --> mqn8+ succ	b4153+b4152+b4151+b4154
FUM	fumarasa	[c] : fum + h2o <==> mal- L	b1612, b4122, b1611
G5SD	glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	[c] : g6p + nadp <==> 6pgl + h + nadph	b1852
GLCpts	Transporte de D-glucosa por medio de PEP:Pyr PTS	glc-D[e] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	b1817, b1818, b2417, b1621, b2416, b1819, b1101, b2415
GLU5K	glutamato 5-cinasa	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	glutamato deshidrogenasa (NADP)	[c] : glu-L + h2o + nadp<==> akg + h + nadph + nh4	b1761
HEX1	hexocinasa (D-glucosa:ATP)	[c] : atp + glc-D --> adp+ g6p + h	b2388
ICL	Isocitrato liasa	[c] : icit --> glx + succ	b4015
LDH_D	D-lactato deshidrogenasa	[c]: lac-D + nad <==> h+ nadh +pyr	b2133,b138p
MALS	malato sintasa	[c]: accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	b4014, b2976
MDH	malato deshidrogenasa	[c]: mal-L + nad <==> h+ nadh + oaa	b3236
ME2	enzima málica (NADP)	[c]: mal-L + nadp --> co2+ nadph + pyr	b2463
NADH12	NADH deshidrogenasa (ubiquinona-8)	[c]: h + nadh + ubq8 --> nad + ubq8h2	b1109
NADH6	NADH deshidrogenasa (ubiquinona-8 y 3,5 protones)	(4,5) h[c] + nadh[c] +ubq8[c] - - > (3,5) h[e] + nad[c] + ubq8h2[c]	b2288+b2277+b2285+b2278+ b2276+b2286+b2287+b2279+ b2280+b2284+b2283+b2282+ b2281
PFK	fosfofructocinasa	[c]: atp + f6p --> adp + fdp + h	b3916, b1723
PFLi	piruvato formiato liasa	[c]: coa + pyr --> accoa+ for	b3114, b3951+b3952, b0902+b2579+b0903
PGDH	fosfogluconato deshidrogenasa	[c]: 6pgc + nadp -> co2+ nadph + ru5p-D	b2029
PGDHY	fosfogluconato deshidratasa	[c]: 6pgc --> 2ddg6p + h2o	b1851
PGI	glucosa-6-fosfato isomerasa	[c]: g6p <==> f6p	b4025

PGL	6-fosfogluconolactonasa	[c]: 6pgl + h2o --> 6pgc+ h	b0767
PPS	fosfoenolpiruvato sintasa	[c]: atp + h2o + pyr --> amp + (2) h + pep + pi	b1702
PRO1z	prolina oxidasa	[c]: fad + pro-L --> 1 pyr5c + fadh2 + h	b1014
PTAr	fosfotransacetilasa	[c]: accoa + pi <==> actp+ coa	b2297
PYK	piruvato cinasa	[c] : adp + h + pep --> atp+ pyr	b1854, b1676
RPE	ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa	[c]: ru5p-D <==> xu5p-D	b4301, b3386
SUCD4	succinato deshidrogenasa	[c]: fadh2 + ubq8 <==> fad + ubq8h2	b0723+b0721+b0724+b0722
SUCOAS	succinil-CoA sintetasa (que forma ADP)	[c]: atp + coa + succ<==> adp + pi + succoa	b0729+b0728
TAL	transaldolasa	[c]: g3p + s7p <==> e4p+ f6p	b2464, b0008
THD2	NAD(P) transhidrogenasa	(2) h[e] + nadh[c] + nadp [c] --> (22 h[c] + nad[c] + nadph[c]	b1602+b1603
TKT1	transcetolasa	[c]: r5p + xu5p-D <==> g3p + s7p	b2935, b2465
TKT2	transcetolasa	[c]: e4p + xu5p-D <==> f6p + g3p	b2935, b2465
TPI	triosa-fosfato isomerasa	[c] : dhap <==> g3p	b3919

Tabla 3: Lista de las abreviaturas de metabolitos, los correspondientes nombres y ubicaciones de todos los metabolitos que participan en las reacciones enumeradas en la tabla 2.

Abreviatura del metabolito	Compartimento	Nombre del metabolito
1pyr5c	Citosol	1-Pirrolina-5-carboxilato
2ddg6p	Citosol	2-Desidro-3-desoxi-D-gluconato 6-fosfato
6pgc	Citosol	6-Fosfo-D-gluconato
6pgl	Citosol	6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona
ac	Citosol	Acetato
accoa	Citosol	Acetil-CoA
actp	Citosol	Acetilfosfato
adp	Citosol	ADP
akg	Citosol	2-Oxoglutarato
ala-D	Citosol	D-Alanina
ala-L	Citosol	L-Alanina
amp	Citosol	AMP
asn-L	Citosol	L-Asparagina
asp-L	Citosol	L-Aspartato
atp	Citosol	ATP
cbp	Citosol	Carbamioilfosfato
cit	Citosol	Citrato

co2	Citosol	CO2
coa	Citosol	Coenzima A
ctp	Citosol	CTP
dha	Citosol	Dihidroxiacetona
dhap	Citosol	Dihidroxiacetonafofato
e4p	Citosol	D-Eritrosa 4-fosfato
etoh	Citosol	Etanol
f6p	Citosol	D-Fructosa 6-fosfato
fad	Citosol	FAD
fadh2	Citosol	FADH2
fdp	Citosol	D-Fructosa 1,6-bisfosfato
for	Citosol	Formiato
fum	Citosol	Fumarato
g3p	Citosol	Gliceraldehído 3-fosfato
g6p	Citosol	D-Glucosa 6-fosfato
glc-D	Citosol	D-Glucosa
glp-D[e]	Fuera del organismo	D-Glucosa
glu5p	Citosol	L-Glutamato 5-fosfato
glu5sa	Citosol	L-Glutamato 5-semialdehído
glu-L	Citosol	L-Glutamato
glx	Citosol	Glioxilato
h	Citosol	H+
h[e]	Fuera del organismo	H+
h2	Citosol	H2
h2o	Citosol	H2O
icit	Citosol	Isocitrato
k	Citosol	K+
lac-D	Citosol	D-Lactato
mal-L	Citosol	L-Malato
mql8	Citosol	Menaquinol 8
mqn8	Citosol	Menaquinona 8
nad	Citosol	Nicotinamida adenina dinucleótido
nadh	Citosol	Nicotinamida adenina dinucleótido - reducido
nadp	Citosol	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nadph	Citosol	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - reducido
nh4	Citosol	Amonio
o2	Citosol	O2
oaa	Citosol	Oxaloacetato
pep	Citosol	Fosfoenolpiruvato
pi	Citosol	Fosfato

ppi	Citosol	Difosfato
pro-L	Citosol	L-Prolina
pyr	Citosol	Piruvato
r5p	Citosol	alfa-D-Ribosa 5-fosfato
ru5p-D	Citosol	D-Ribulosa-5-fosfato
s7p	Citosol	Sedoheptulosa 7-fosfato
succ	Citosol	Succinato
succoa	Citosol	Succinil-CoA
ubq8	Citosol	Ubiquinona-8
ubq8h2	Citosol	Ubiquinol-8
xu5p-D	Citosol	D-Xilulosa 5-fosfato

REIVINDICACIONES

1. Organismo microbiano, que comprende una ruta de síntesis de ácidos grasos (FAS) independiente de malonil-CoA y una ruta de reducción de acilos que comprende ácidos nucleicos heterólogos que codifican una ruta de FAS independiente de malonil-CoA y ácidos nucleicos heterólogos que codifican una ruta de reducción de acilos expresados en cantidades suficientes para producir un alcohol primario, en el que dicho alcohol primario es hexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol, dodecanol, tetradecanol o hexadecanol, en el que dicha ruta de FAS independiente de malonil-CoA comprende cetoacil-CoA aciltransferasa o cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa, y dicha ruta de reducción de acilos comprende una acil-CoA reductasa y una alcohol deshidrogenasa, en el que dicha cetoacil-CoA aciltransferasa o cetoacil-CoA tiolasa convierte acil-CoA en β -cetoacil-CoA, en el que dicha 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa convierte β -cetoacil-CoA en β -hidroxiacil-CoA, en el que dicha enoil-CoA hidratasa convierte β -hidroxiacil-CoA en *trans*-2-enoil-CoA, en el que dicha enoil-CoA reductasa convierte *trans*-2-enoil-CoA en acil-CoA, en el que dicha acil-CoA reductasa convierte acil-CoA en un aldehído, en el que dicha alcohol deshidrogenasa convierte un aldehído en dicho alcohol primario.
2. Organismo microbiano según la reivindicación 1, en el que dicho alcohol primario se produce en cantidades de niveles de al menos el 10 % mayores en comparación con un organismo microbiano que carece de dicho ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima de la ruta de FAS independiente de malonil-CoA.
3. Organismo microbiano según la reivindicación 1, en el que dichos ácidos nucleicos heterólogos codifican cetoacil-CoA aciltransferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa.
4. Organismo microbiano según la reivindicación 1, en el que dichos ácidos nucleicos heterólogos codifican cetoacil-CoA tiolasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y enoil-CoA reductasa.
5. Organismo microbiano según la reivindicación 1, en el que dichos ácidos nucleicos heterólogos que codifican una ruta de reducción de acilos comprenden además una enzima que tiene actividad acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa.
6. Organismo microbiano según la reivindicación 5, en el que dicha enzima que tiene actividad acil-CoA reductasa y alcohol deshidrogenasa comprende acil-CoA reductasa (FAR) que forma alcohol graso.
7. Medio de cultivo que comprende el organismo microbiano según la reivindicación 1.
8. Organismo microbiano según la reivindicación 1, en el que dicha ruta de FAS independiente de malonil-CoA se expresa en el citosol.
9. Método para producir un alcohol primario, que comprende cultivar un organismo microbiano según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 u 8 en condiciones sustancialmente anaerobias durante un periodo de tiempo suficiente para producir dicho alcohol primario, en el que dicho alcohol primario es hexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol, dodecanol, tetradecanol o hexadecanol.
10. Método según la reivindicación 9, que comprende además aislar dicho alcohol primario de dicho organismo microbiano.
11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho aislamiento comprende purificación, destilación o cristalización de dicho alcohol primario.

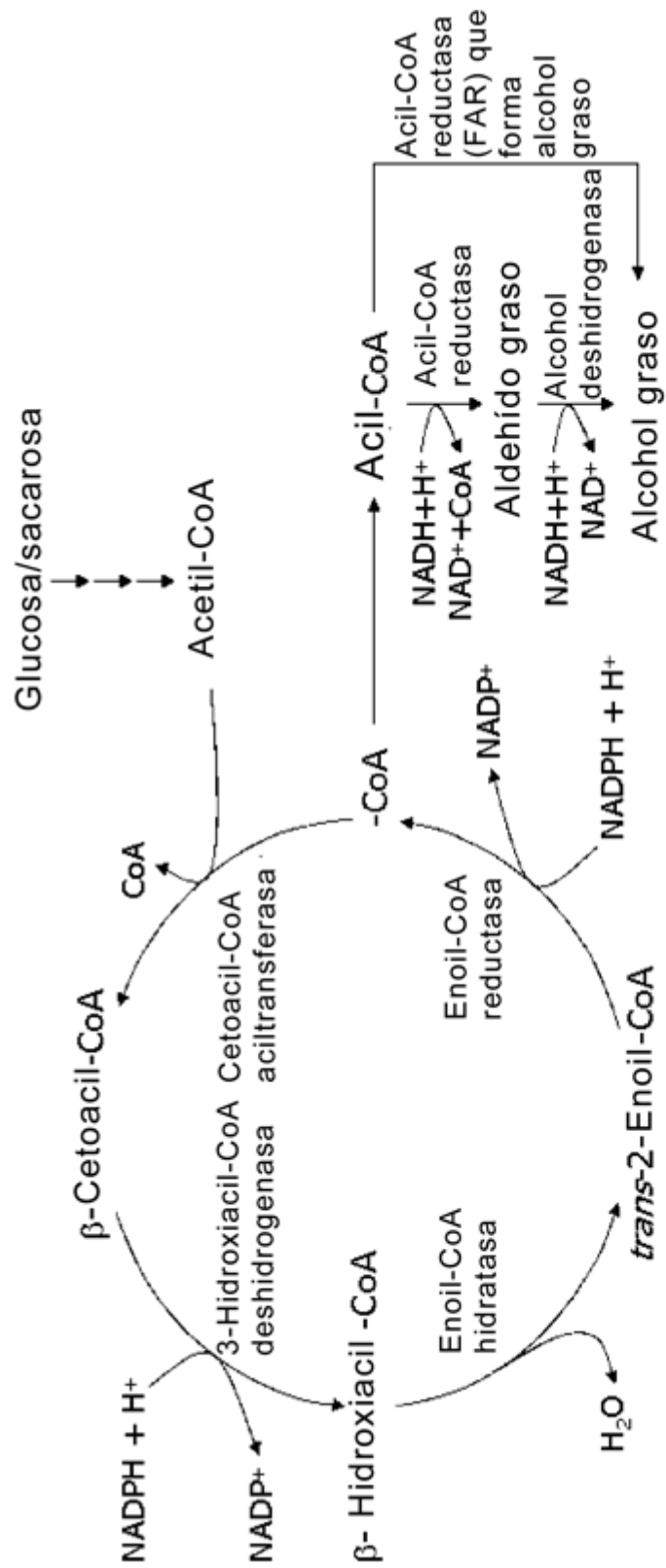


Figura 1

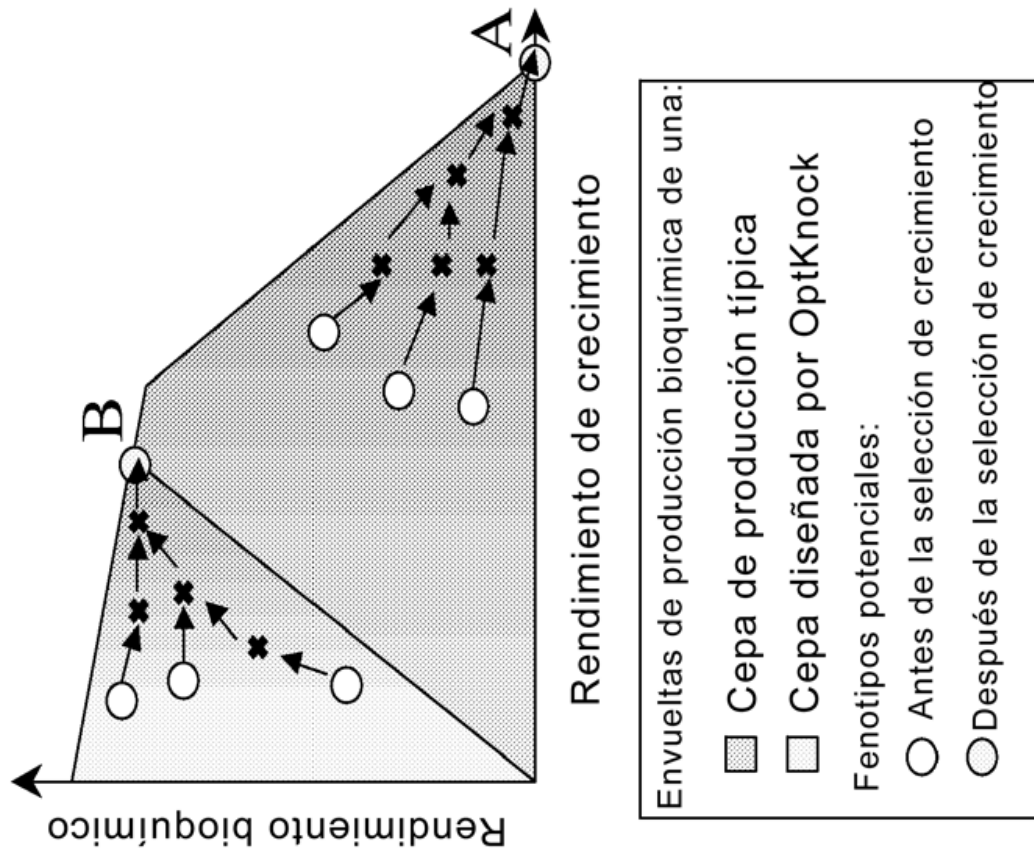


Figura 2

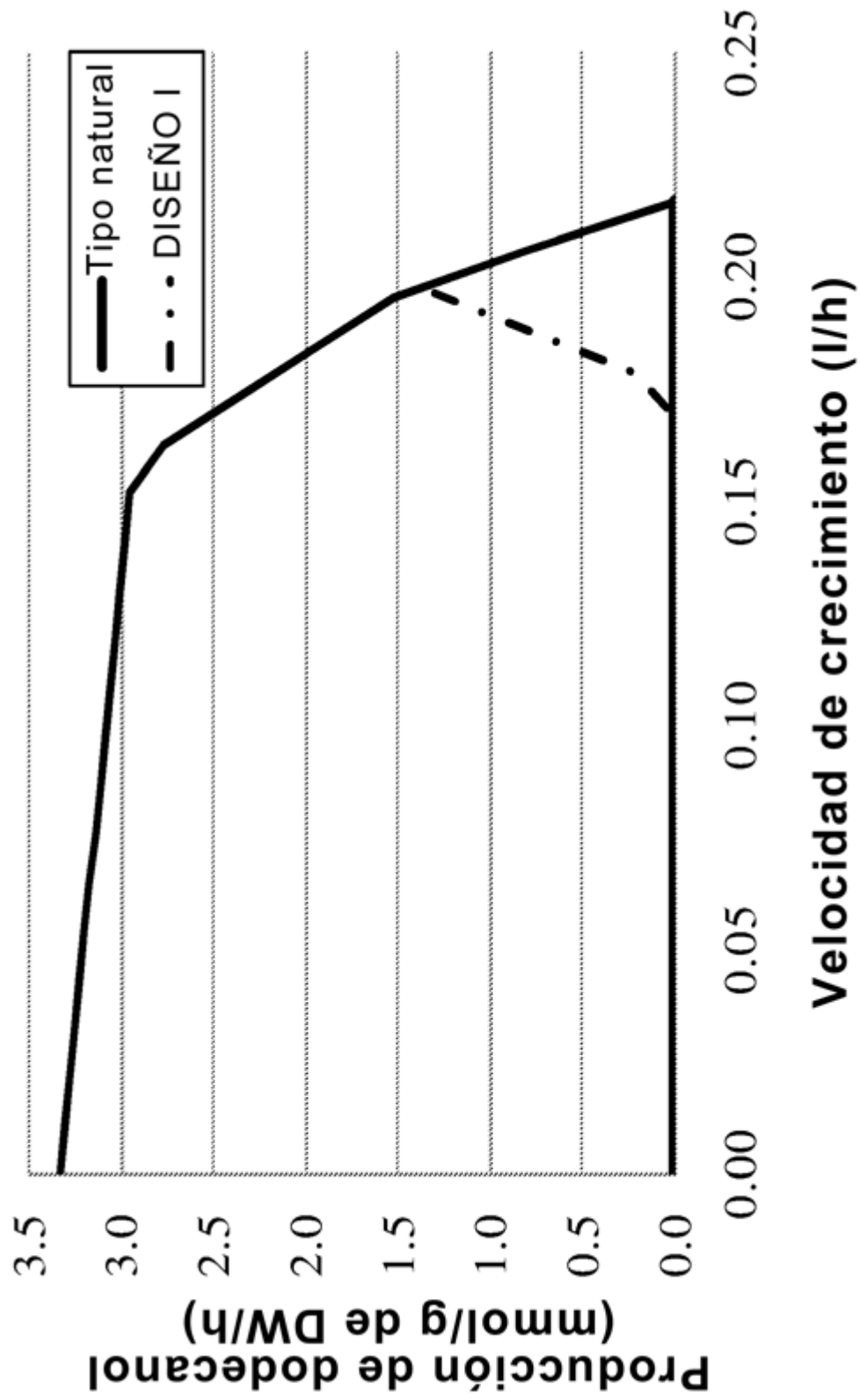


Figura 3

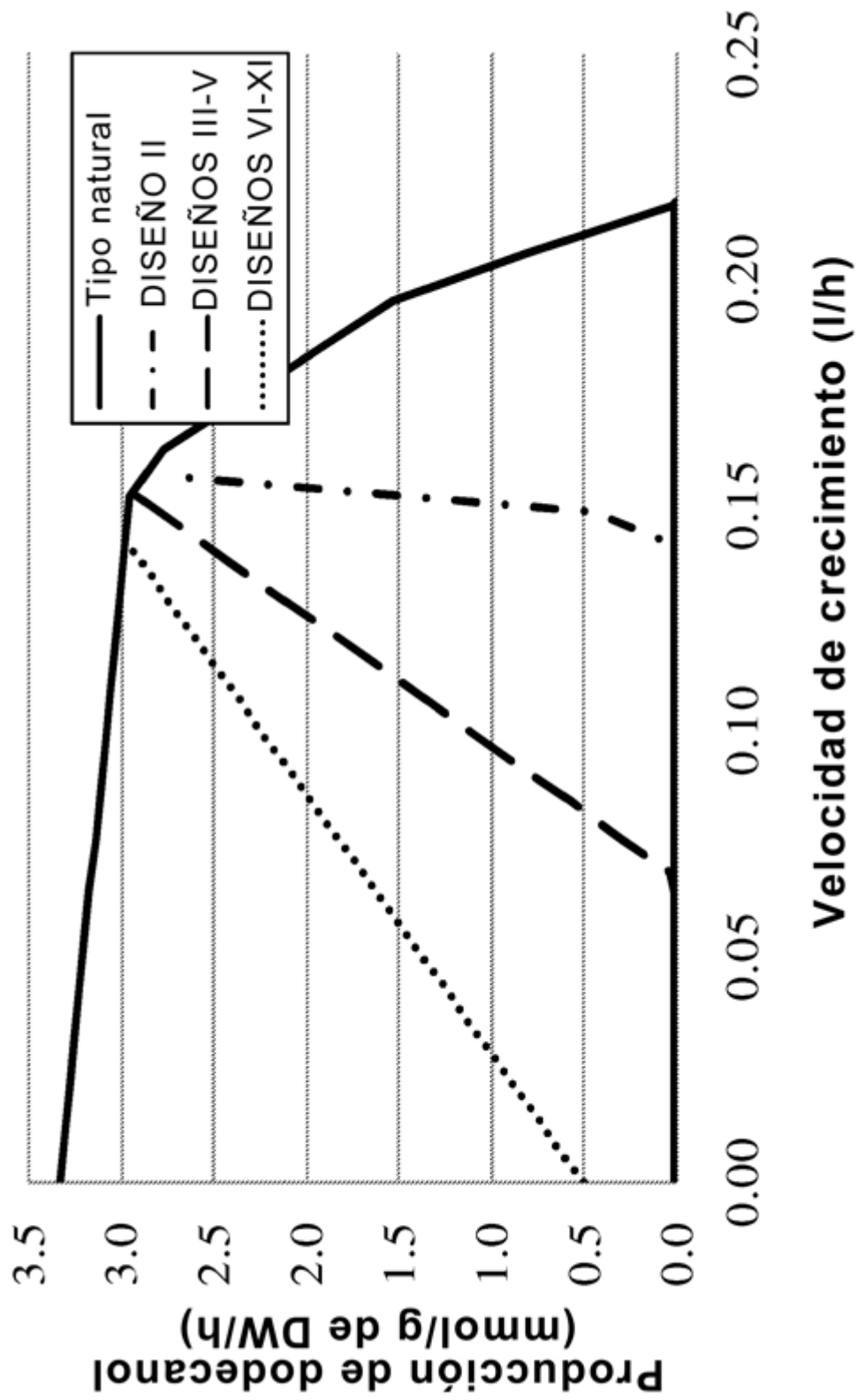


Figura 4

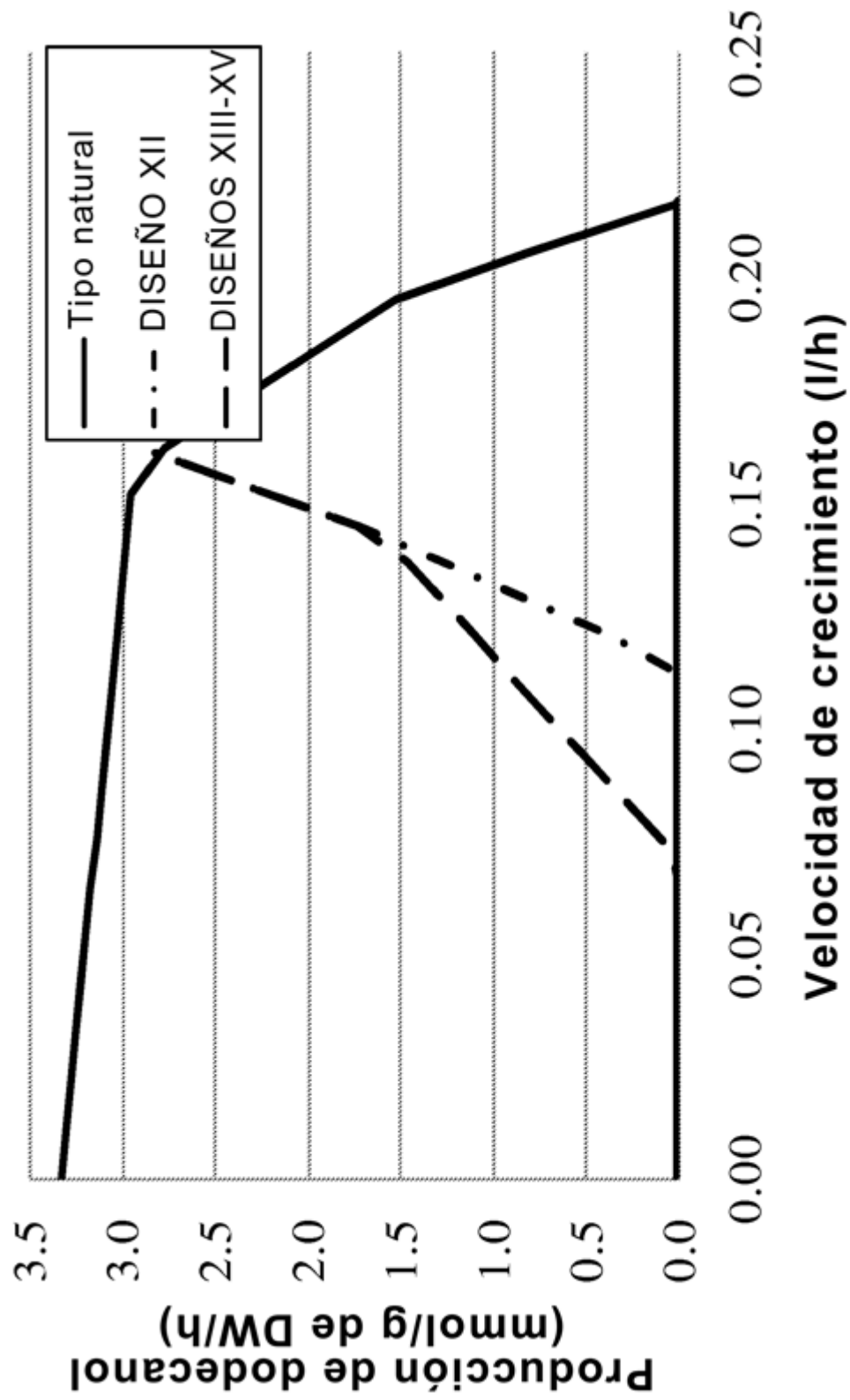


Figura 5

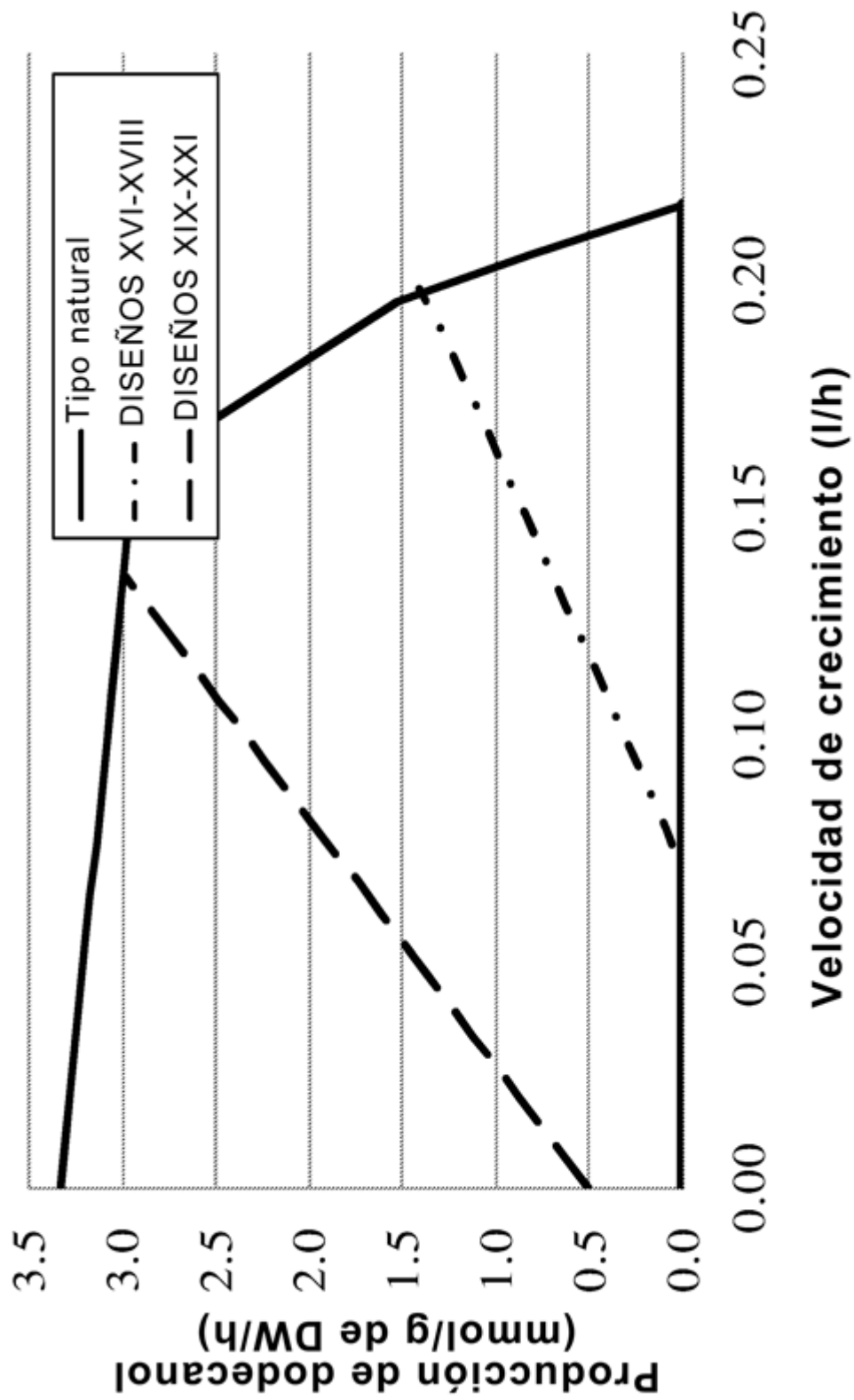


Figura 6

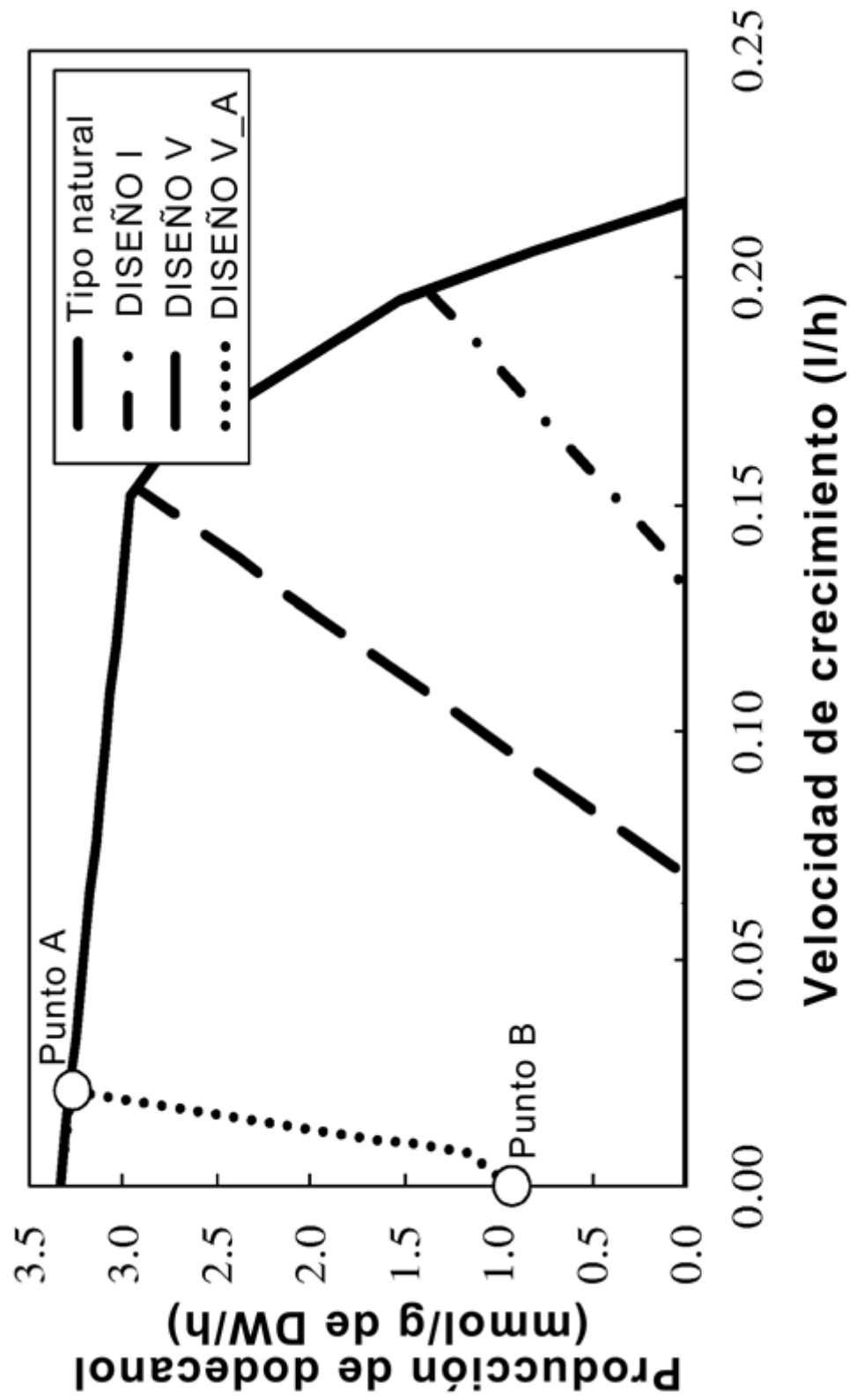


Figura 7

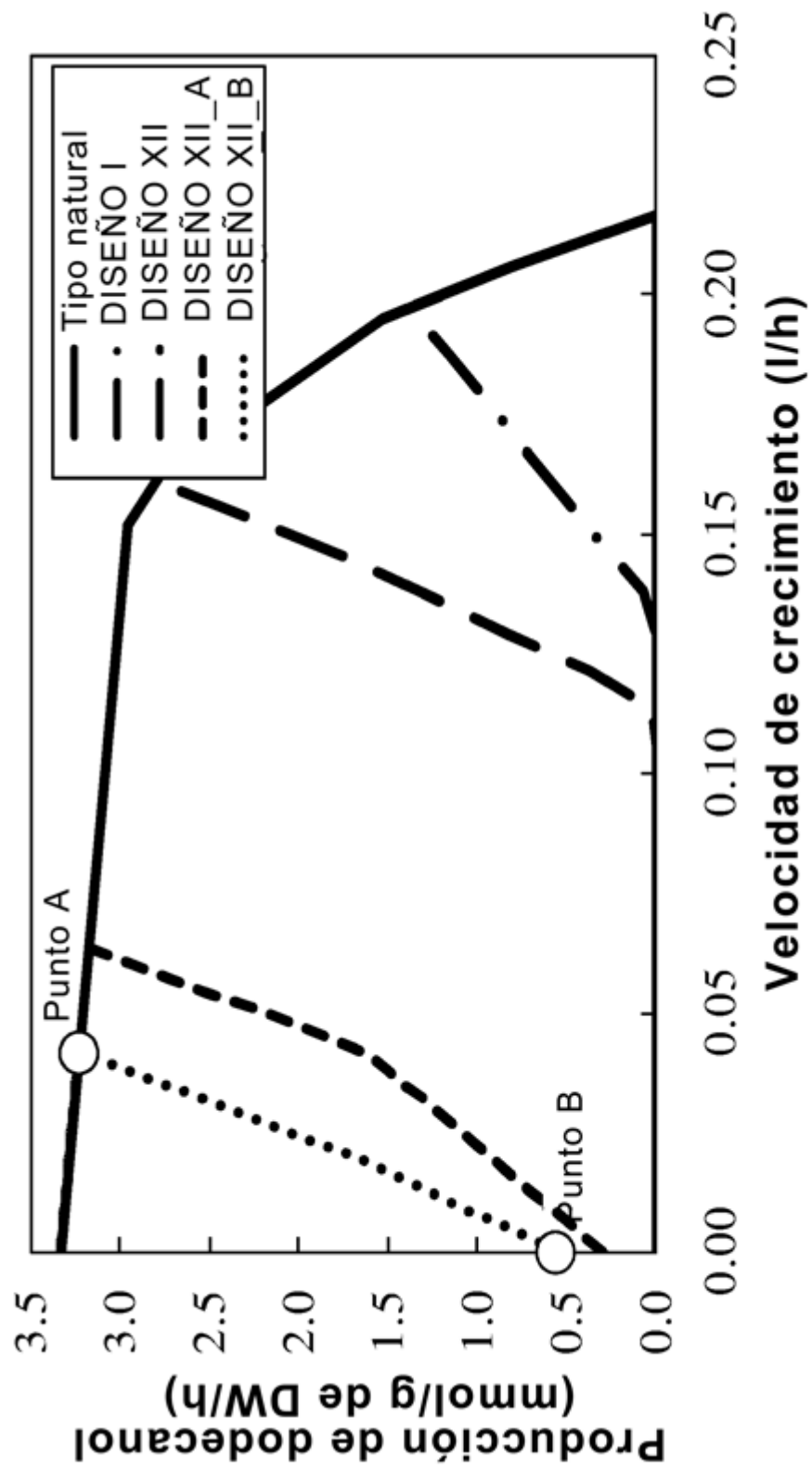


Figura 8

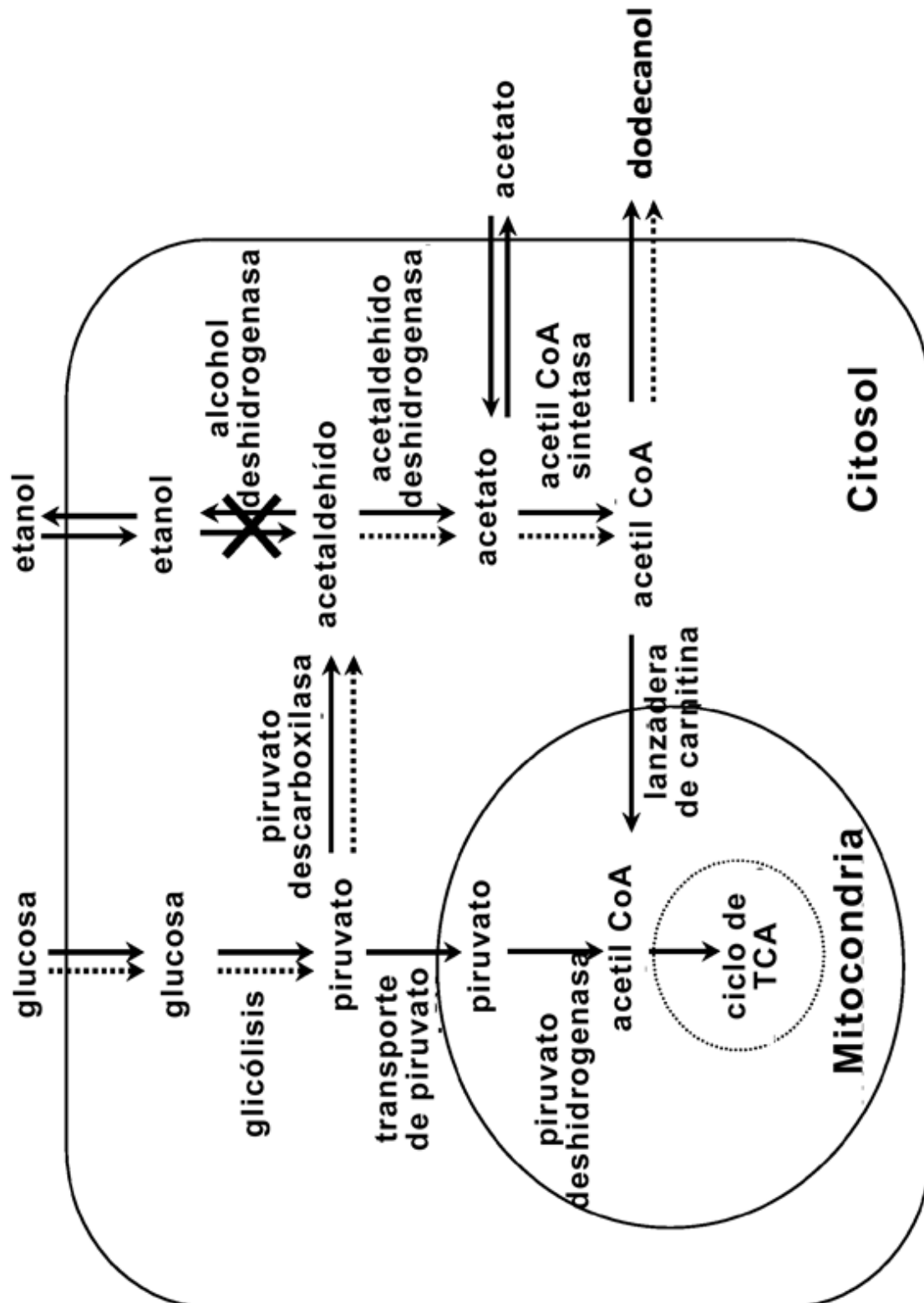


Figura 9a

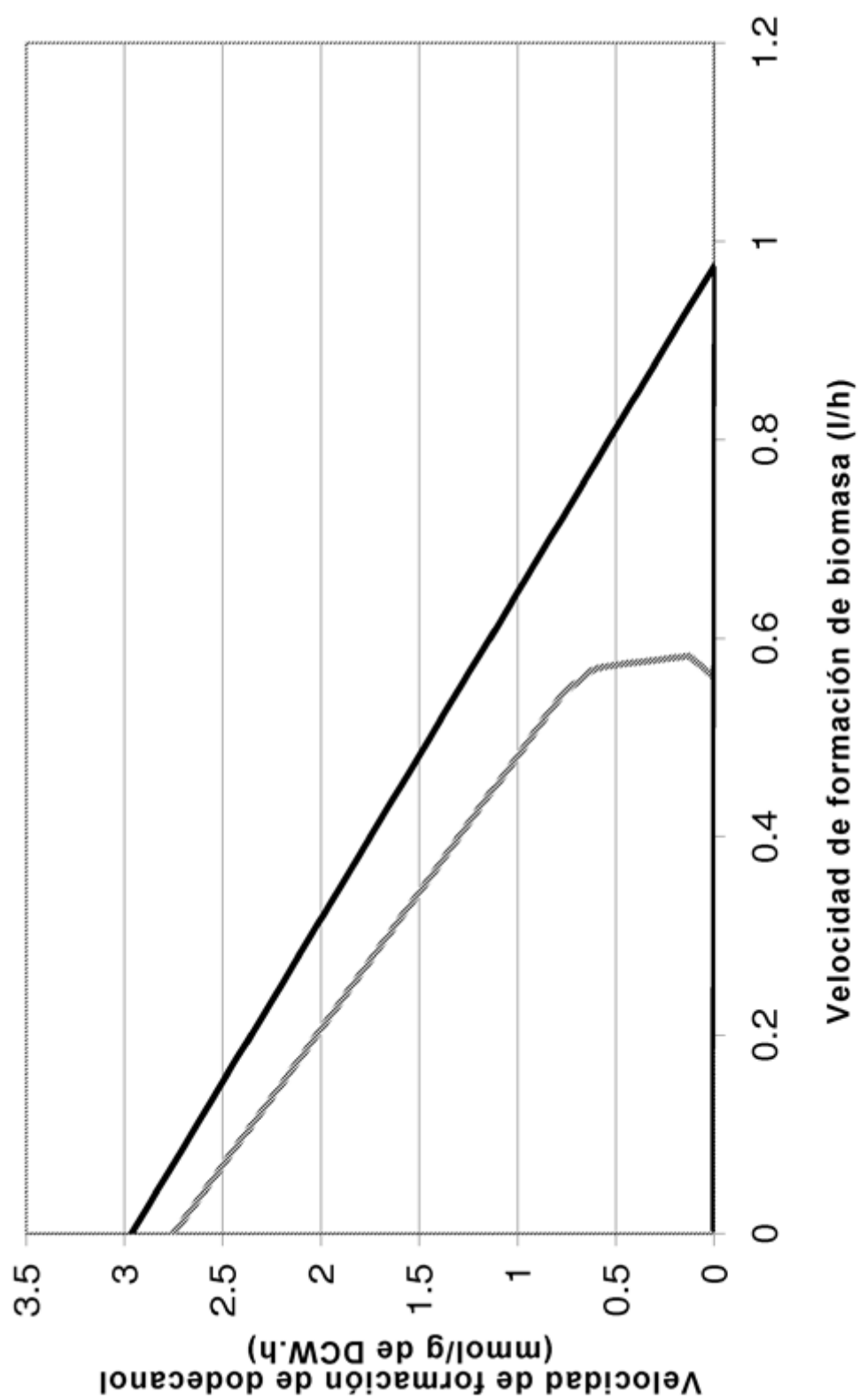


Figura 9b

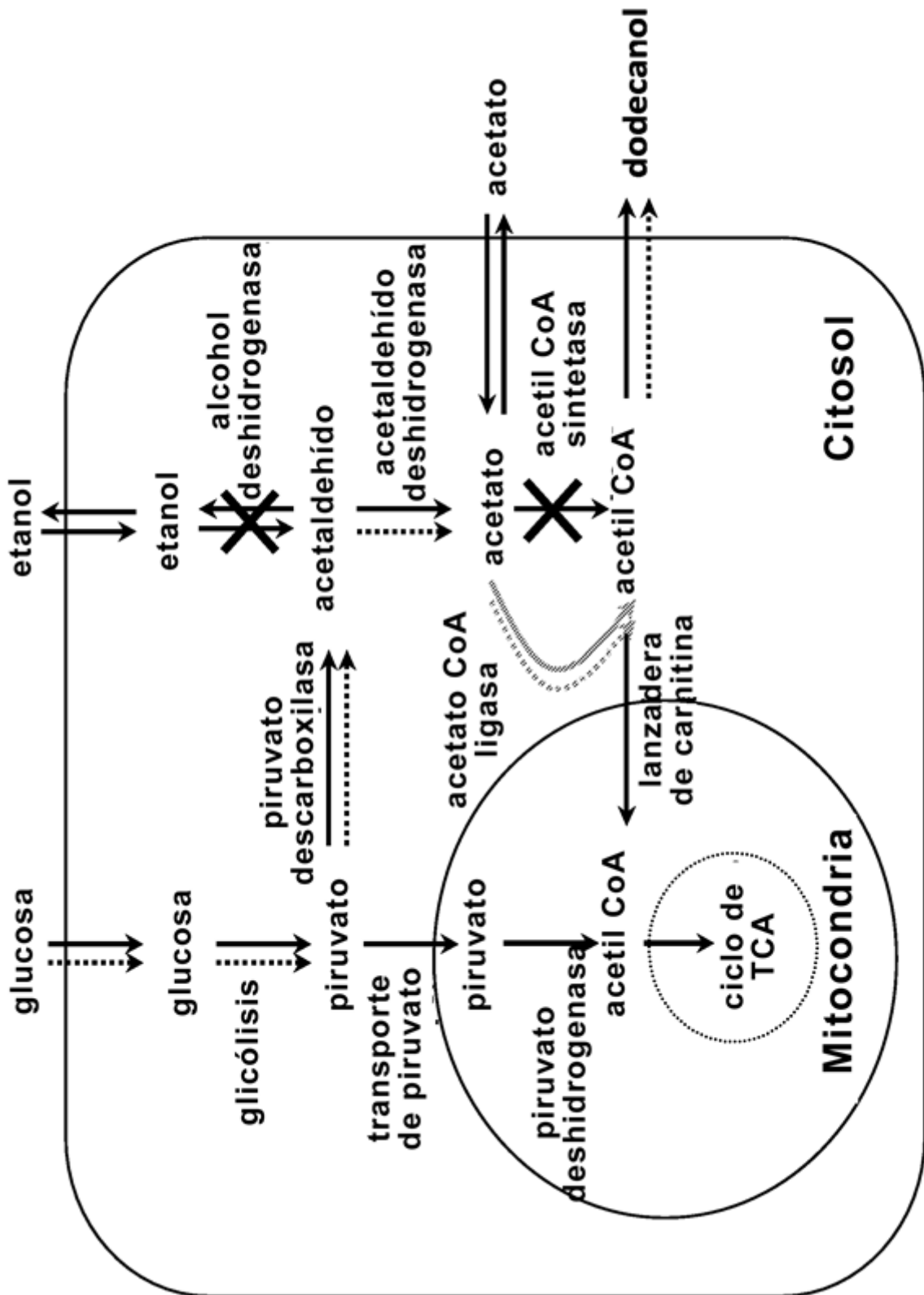


Figura 10a

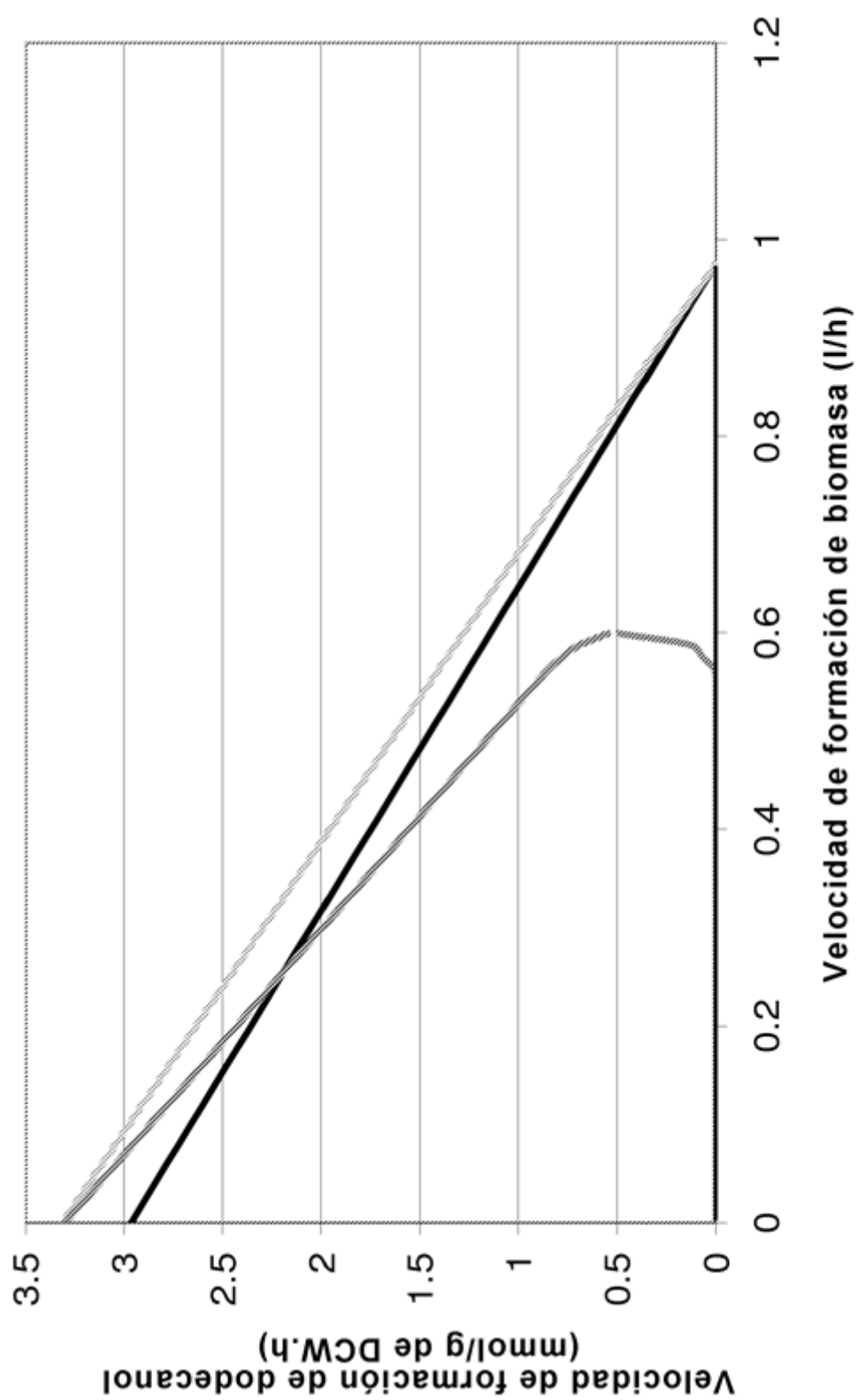


Figura 10b

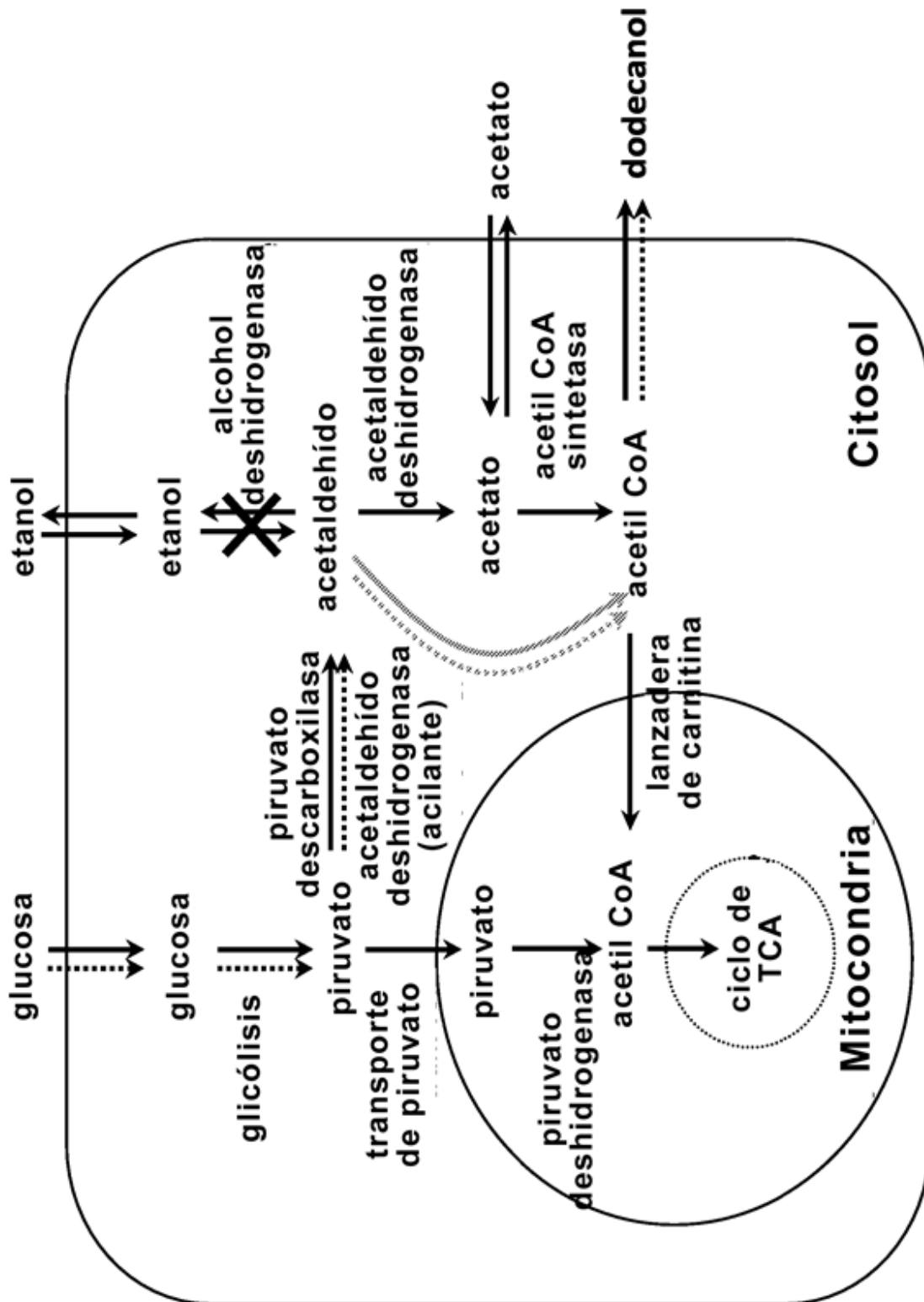


Figura 11a

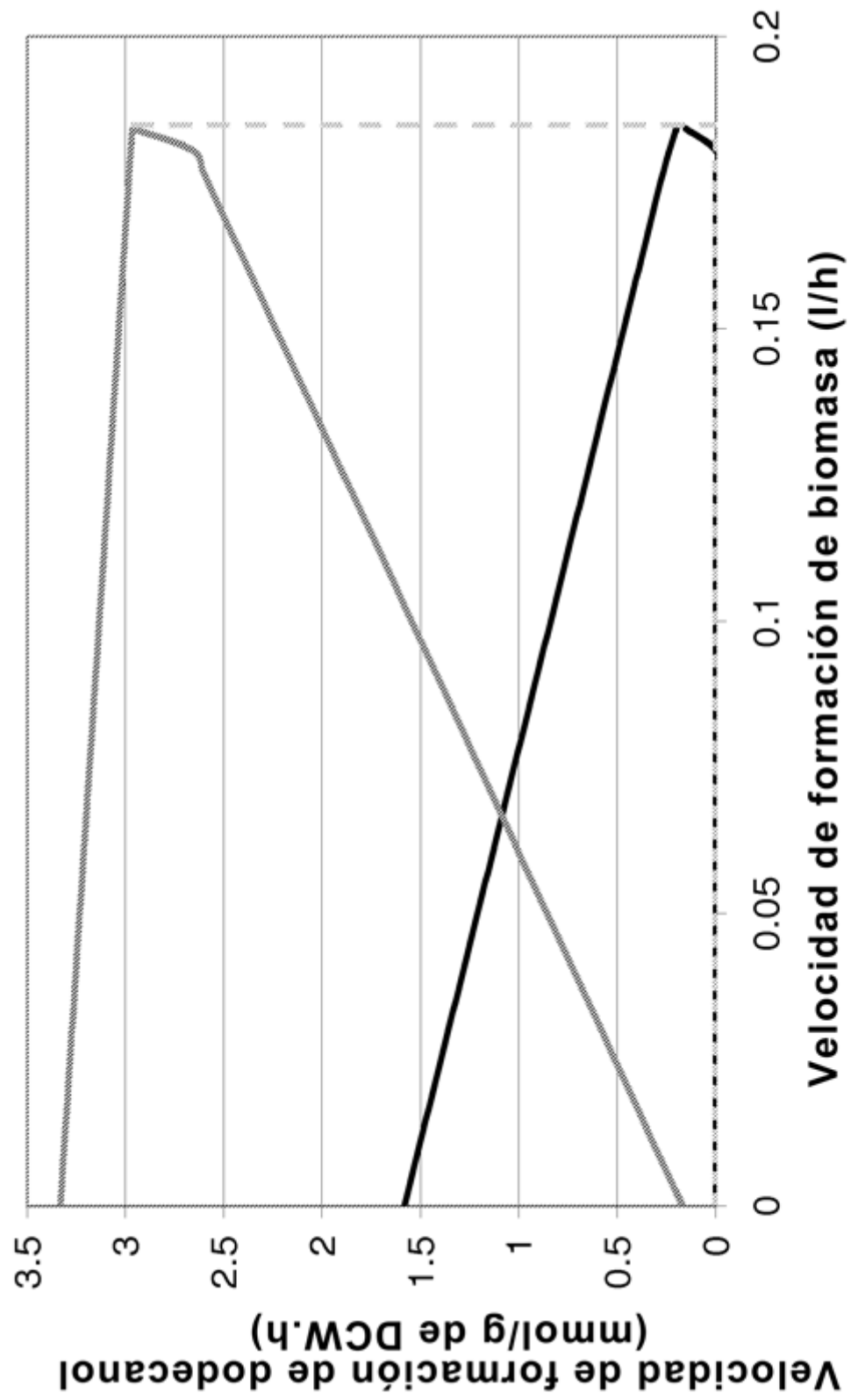


Figura 11b

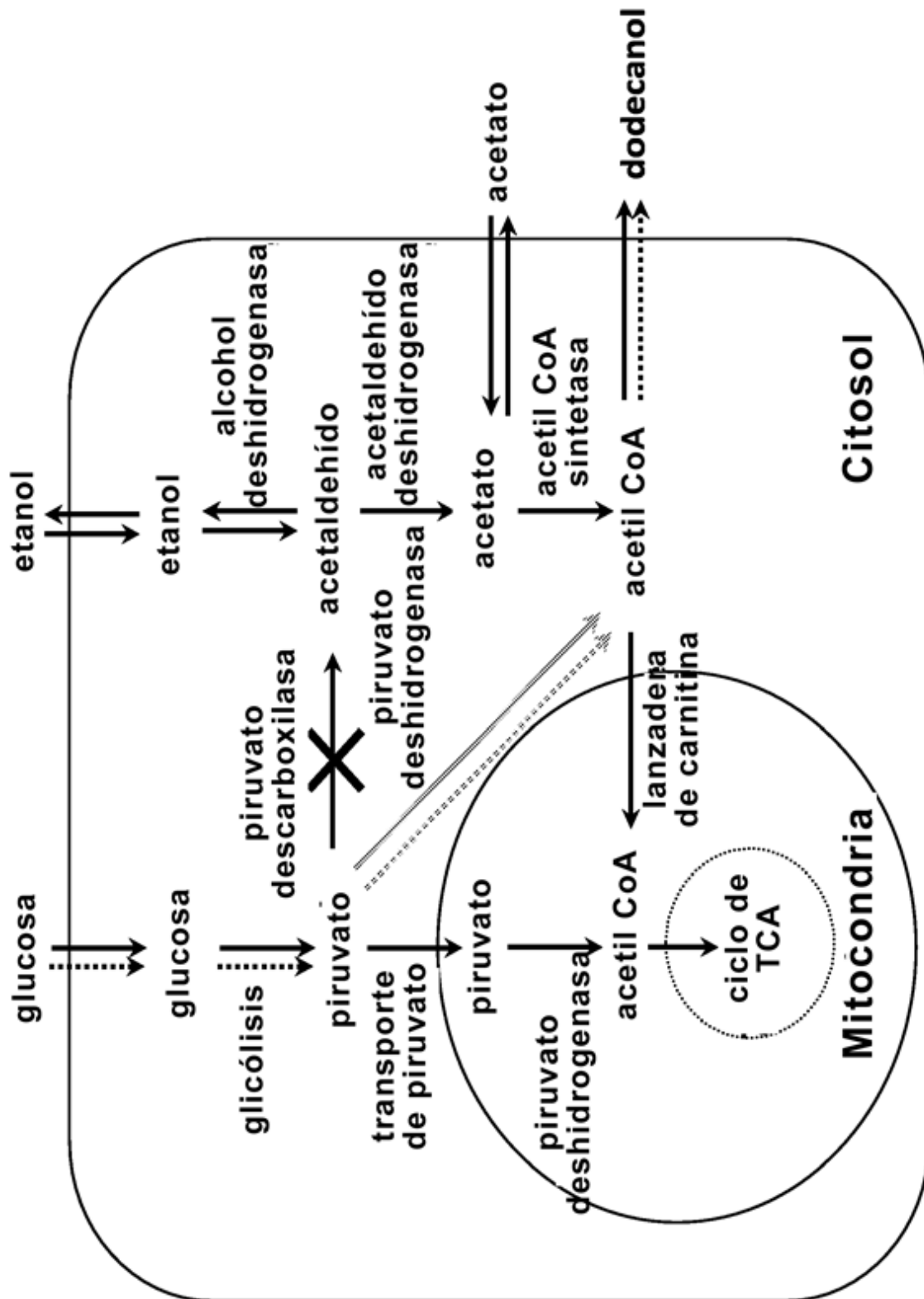


Figura 12

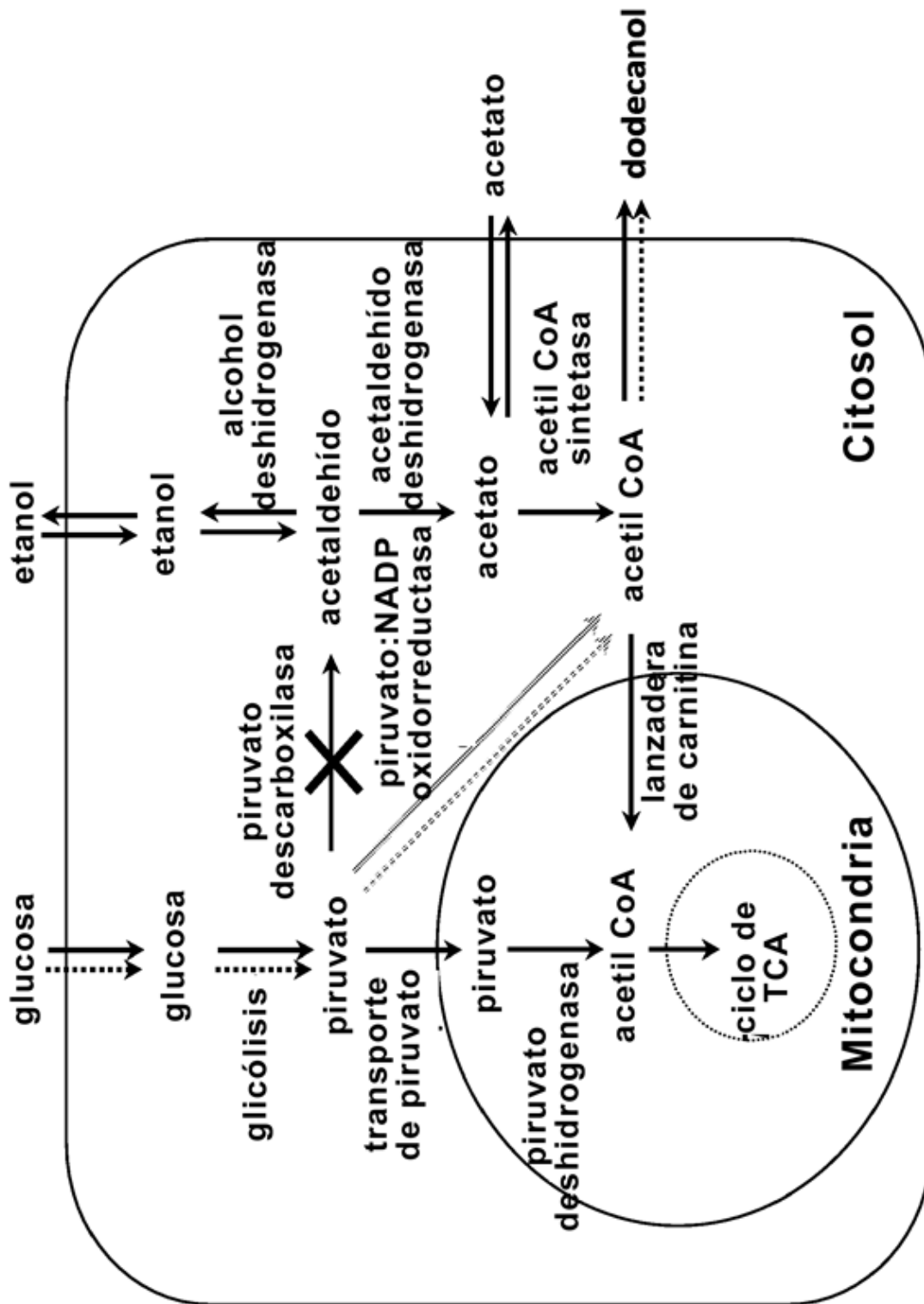


Figura 13

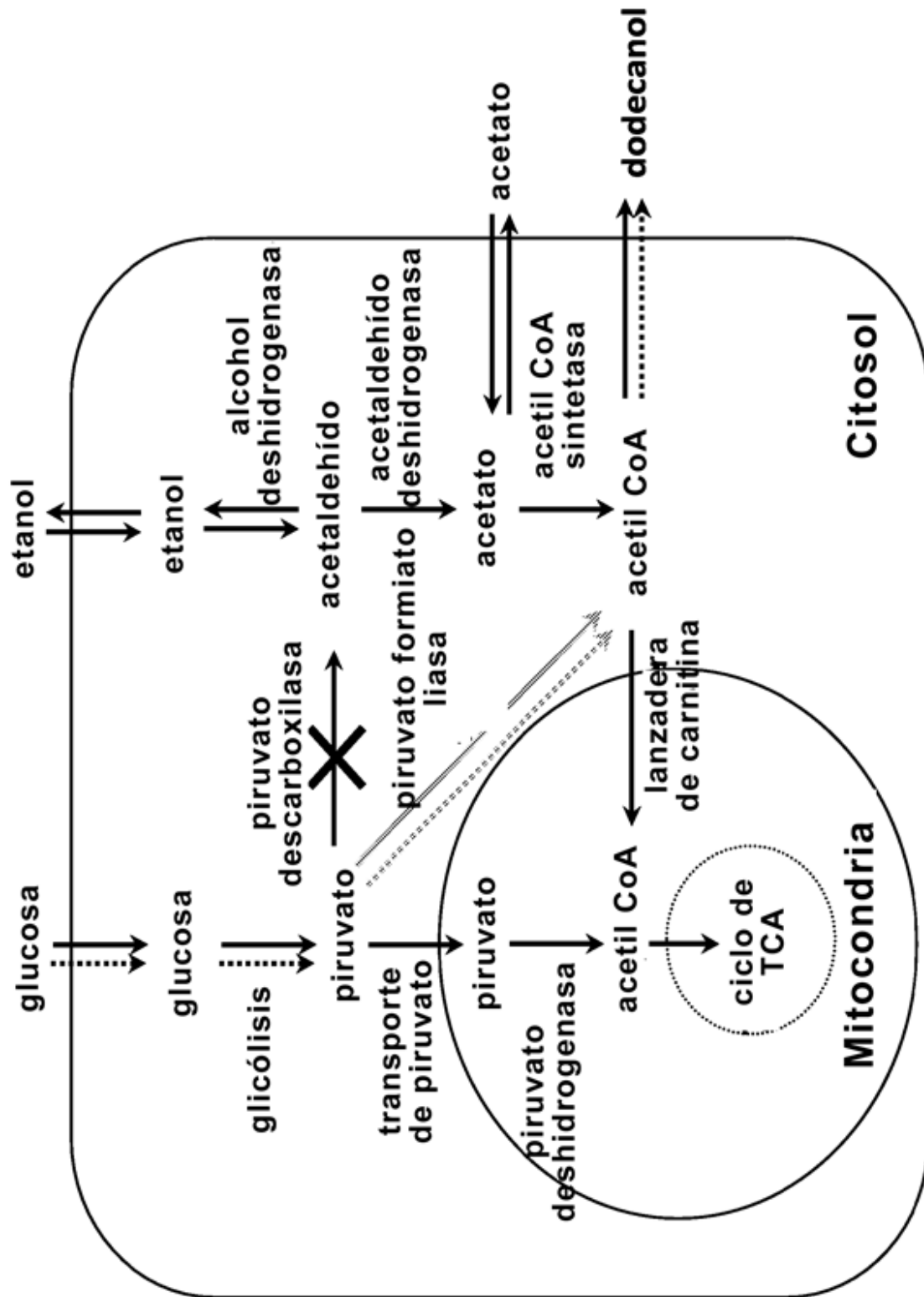


Figura 14

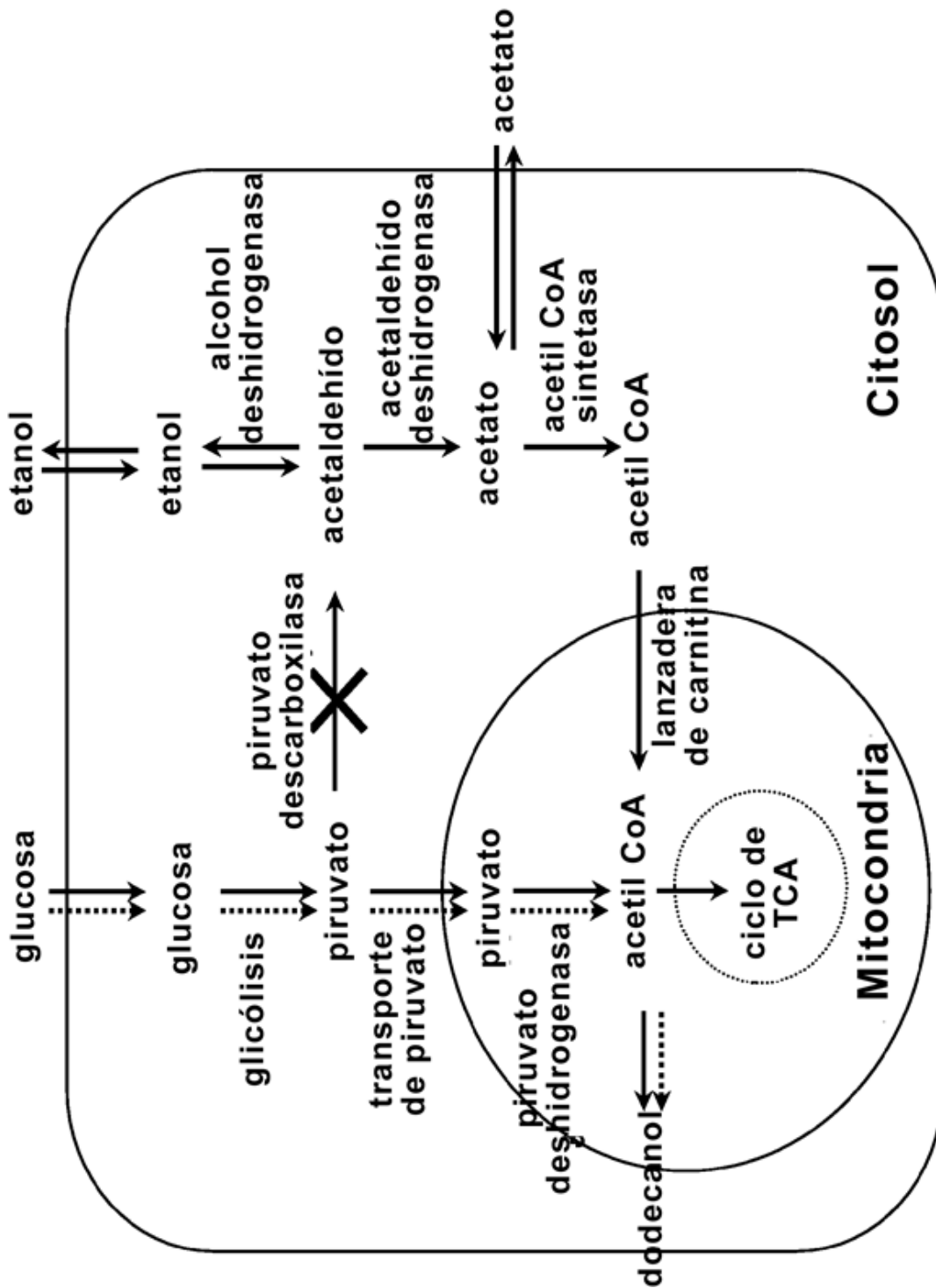


Figura 15a

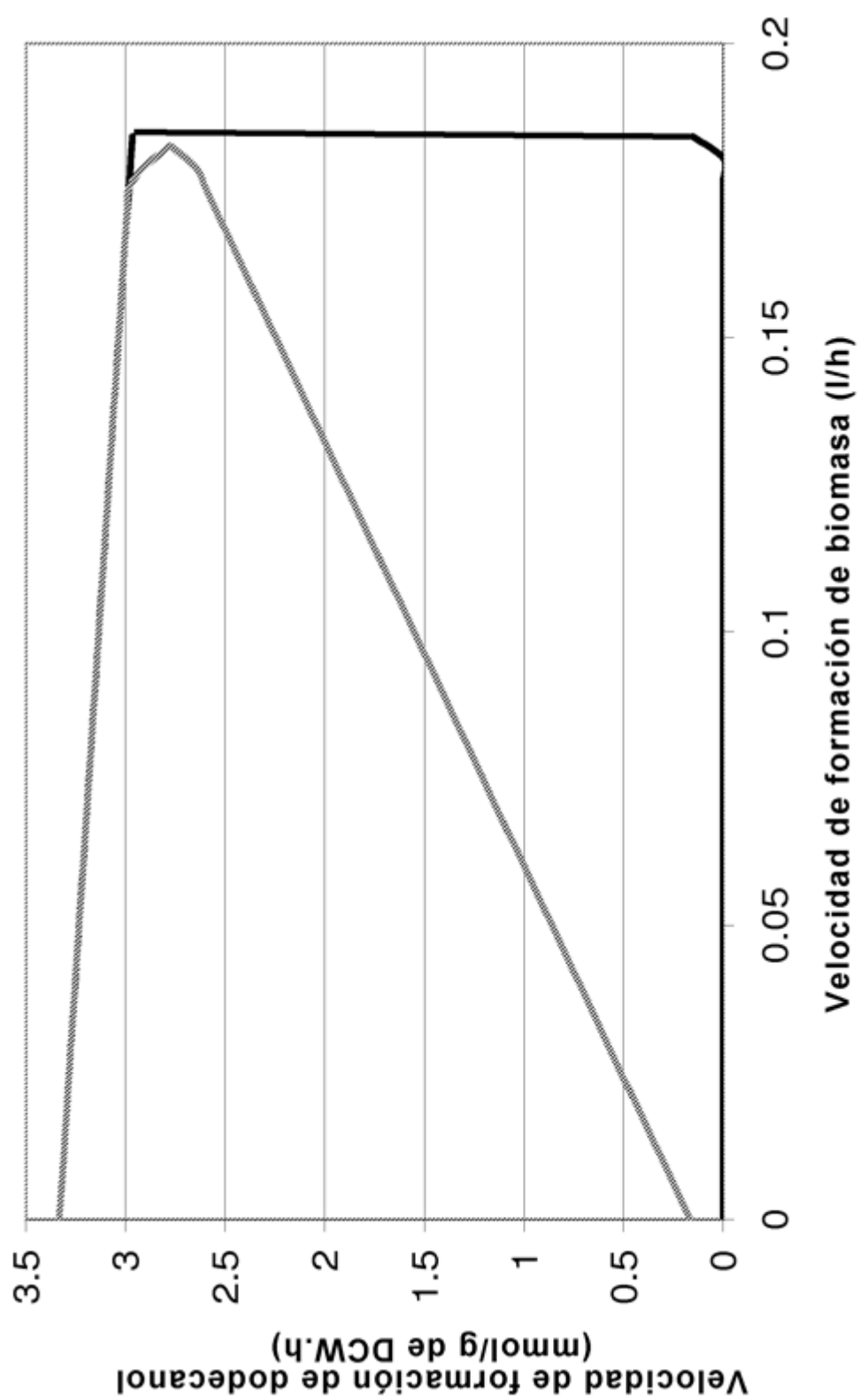


Figura 15b

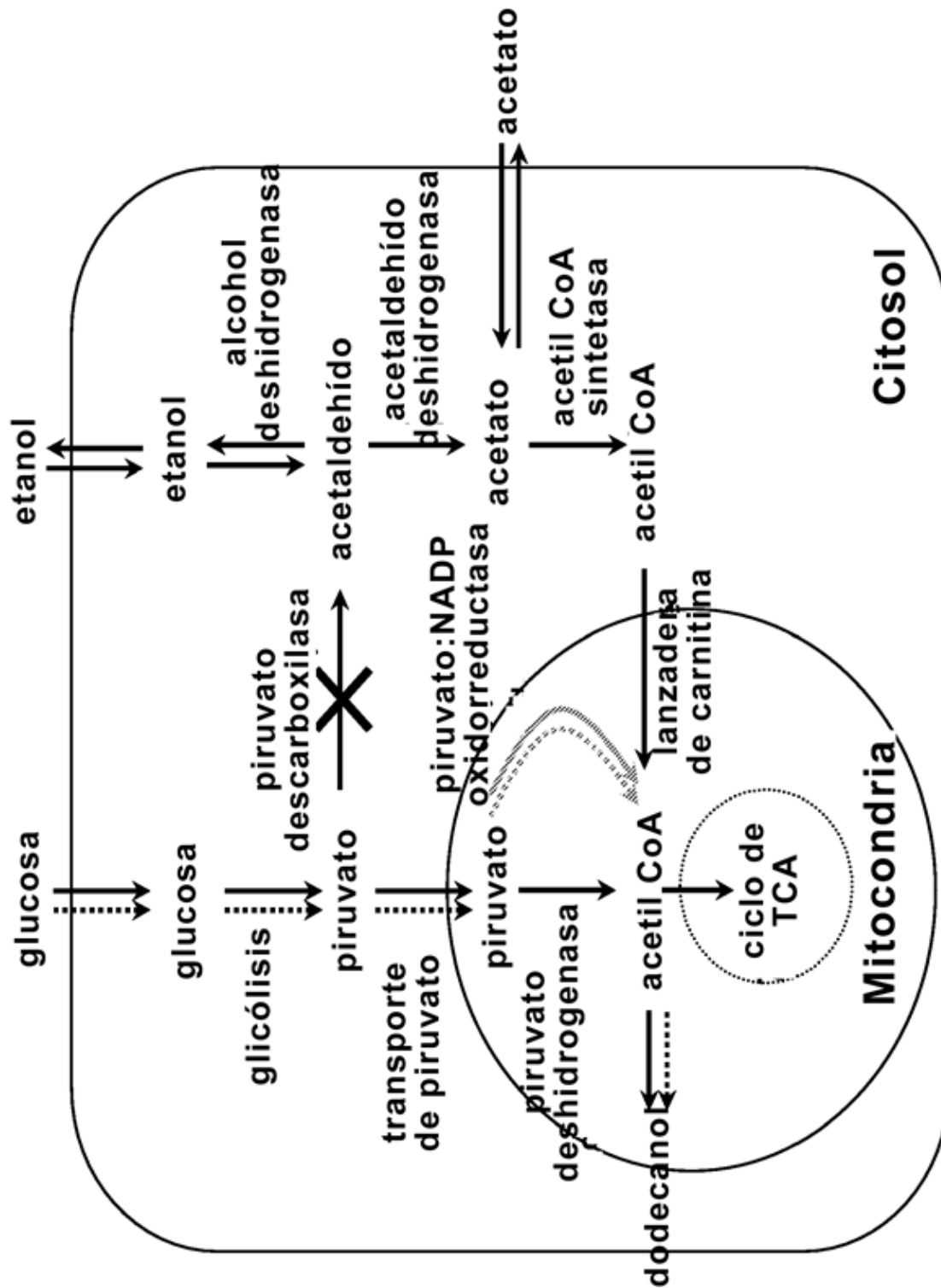


Figura 16

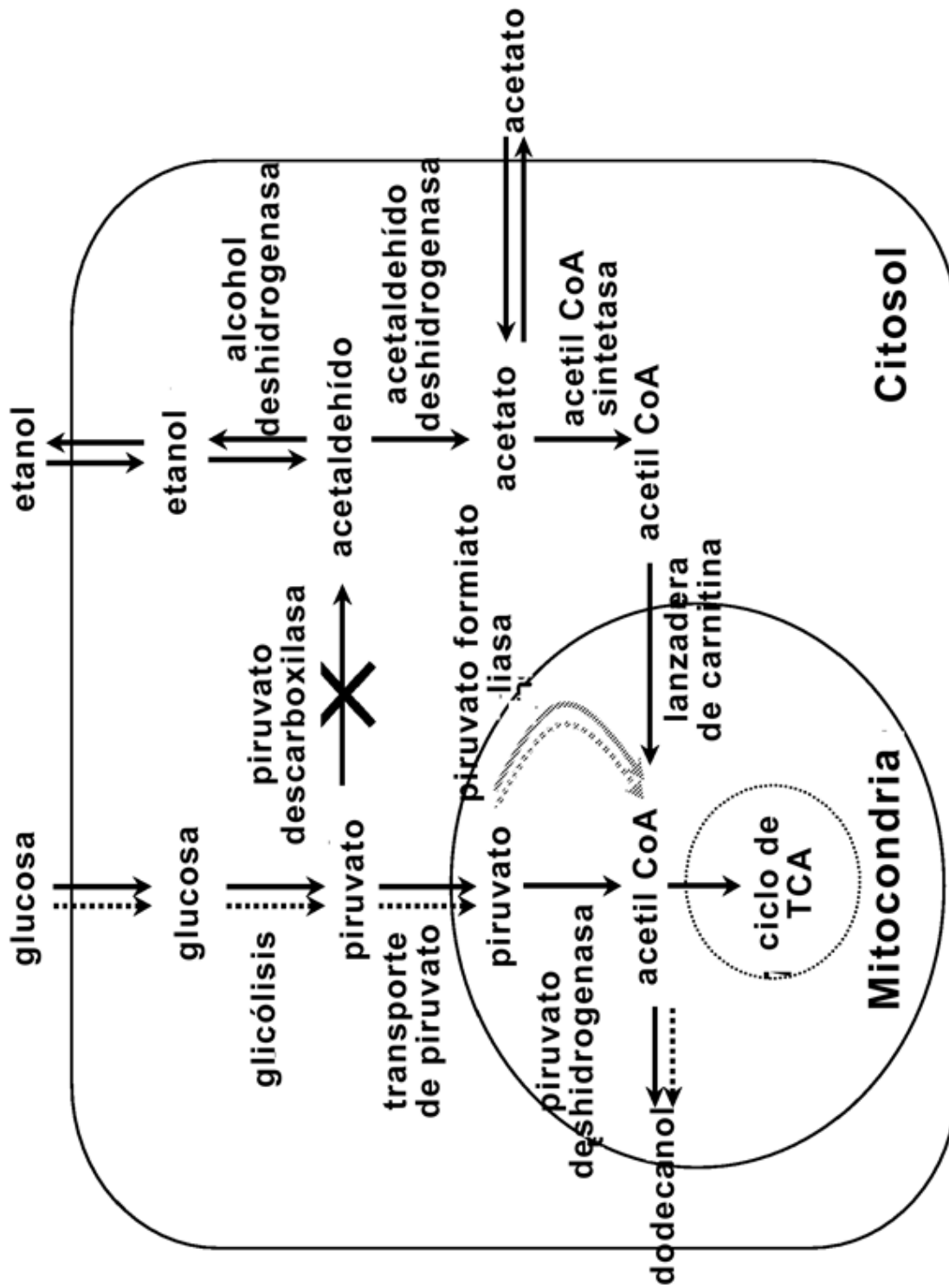


Figura 17

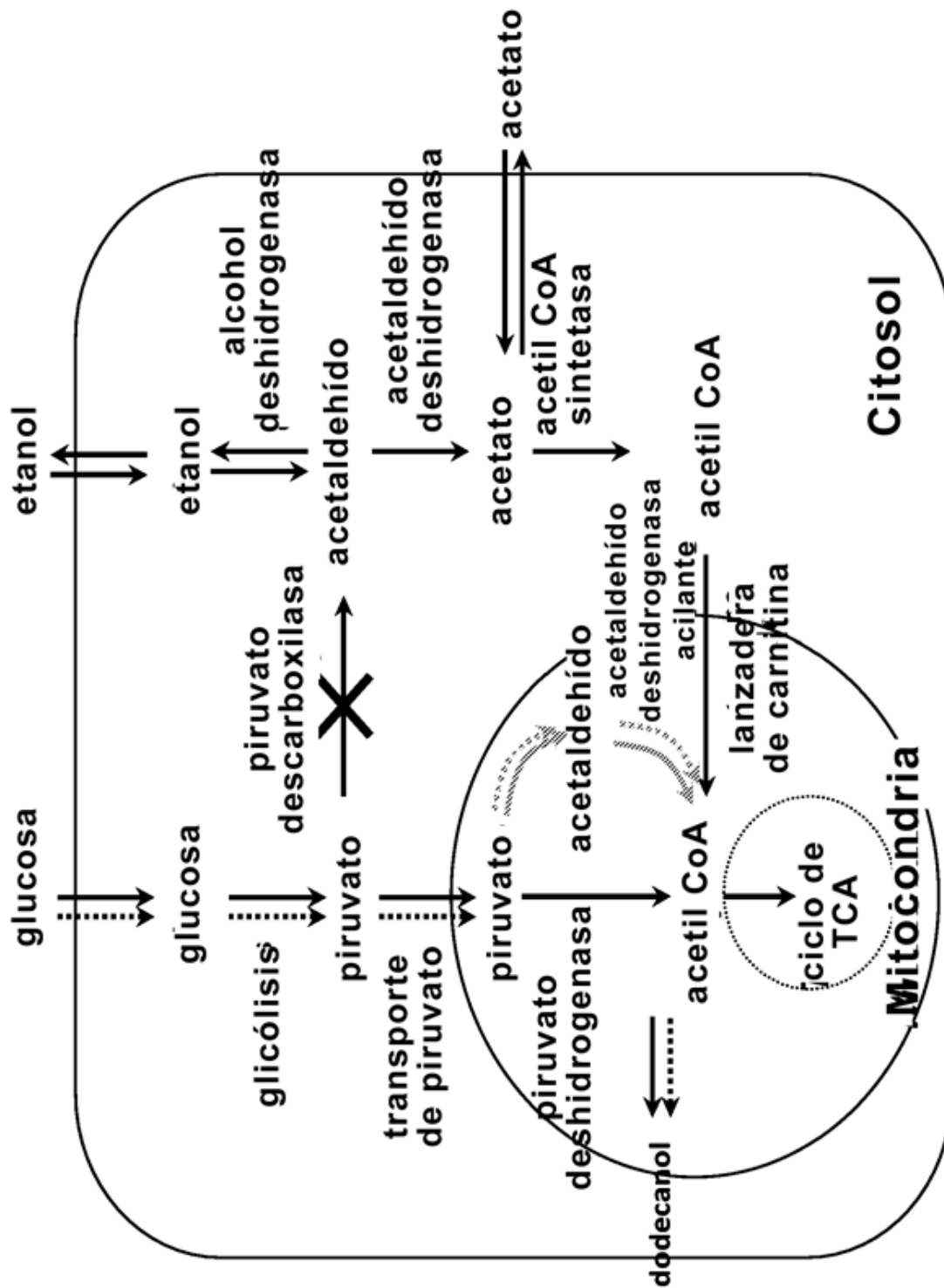


Figura 18

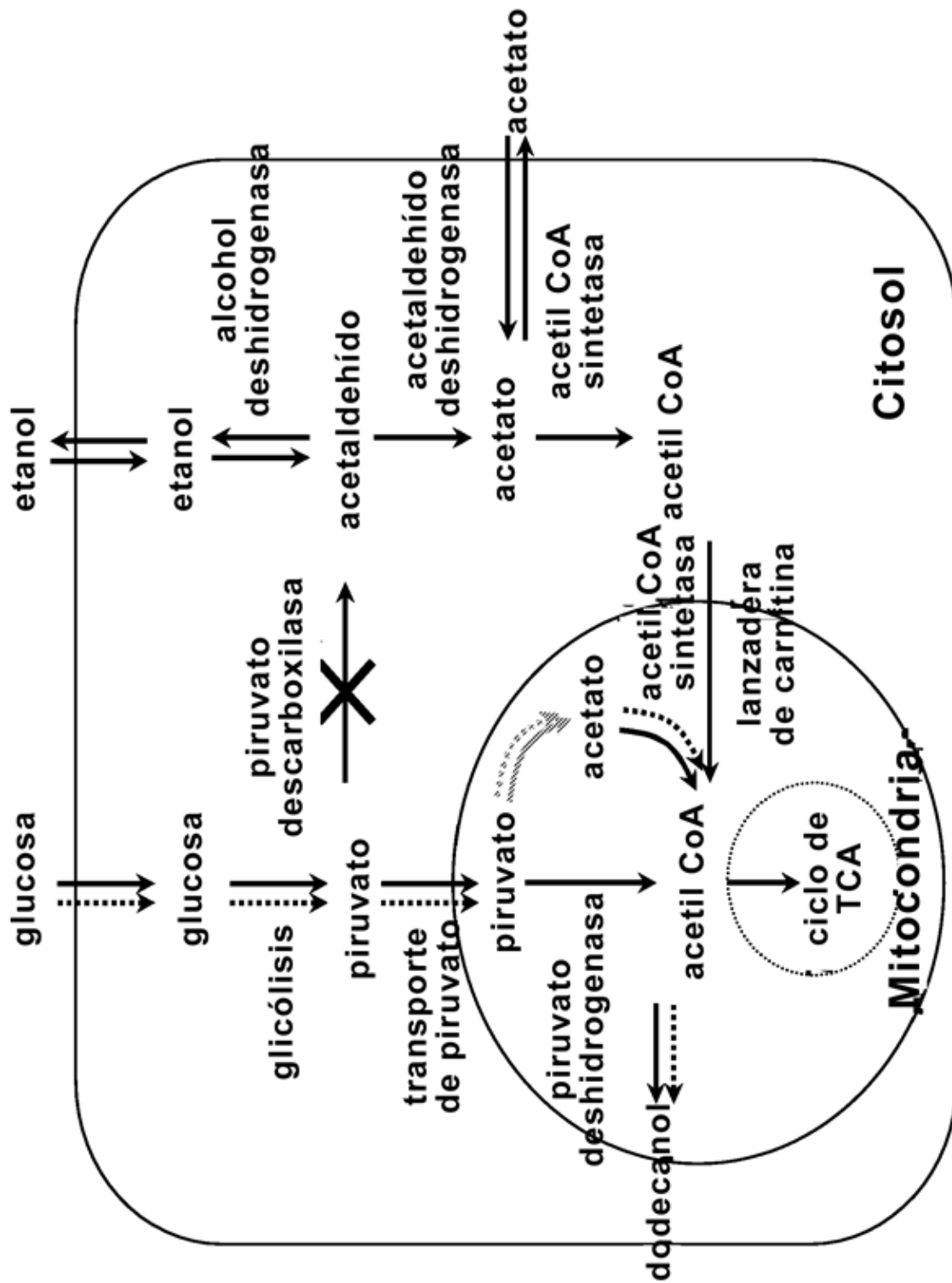


Figura 19a

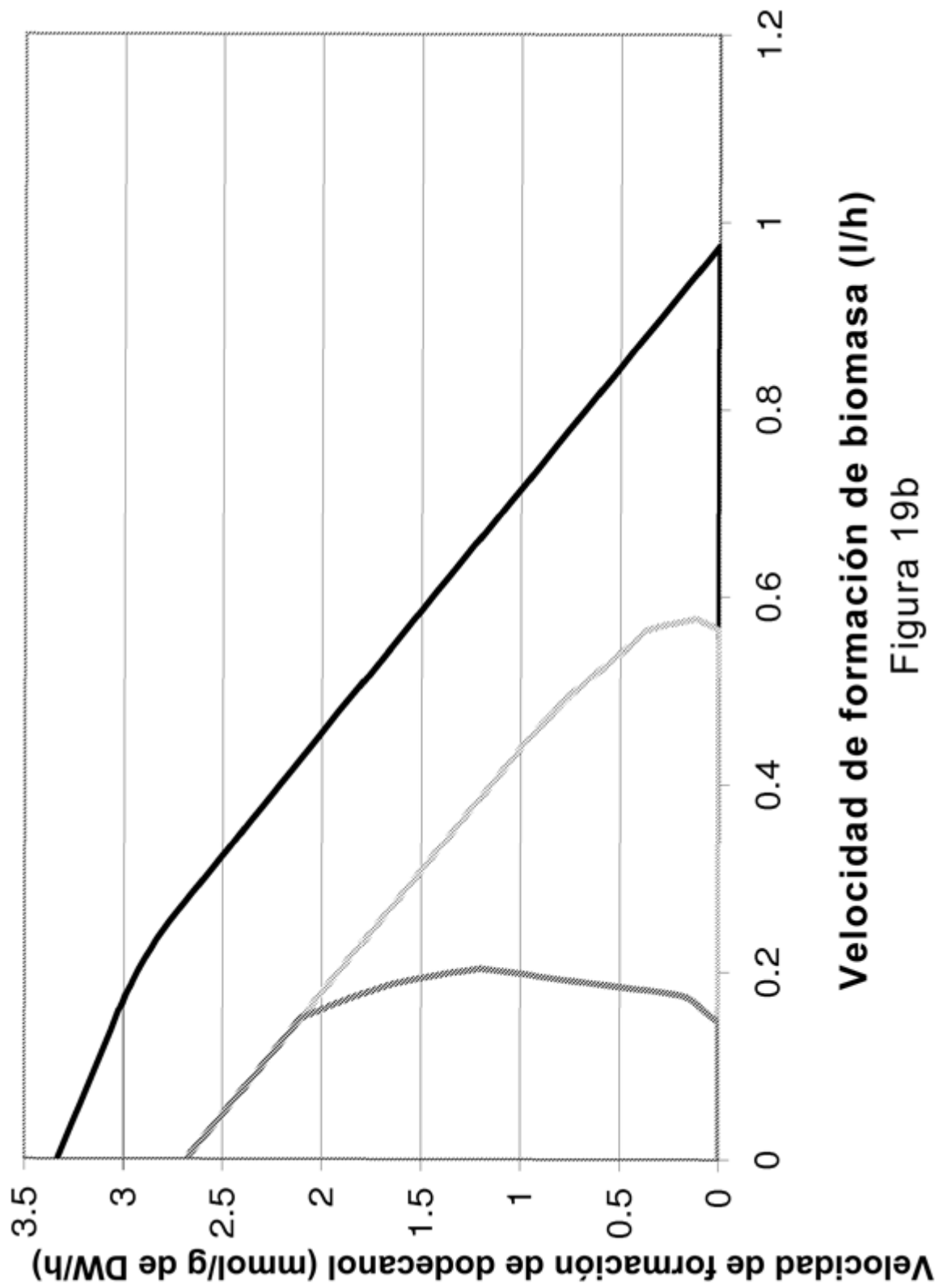


Figura 19b

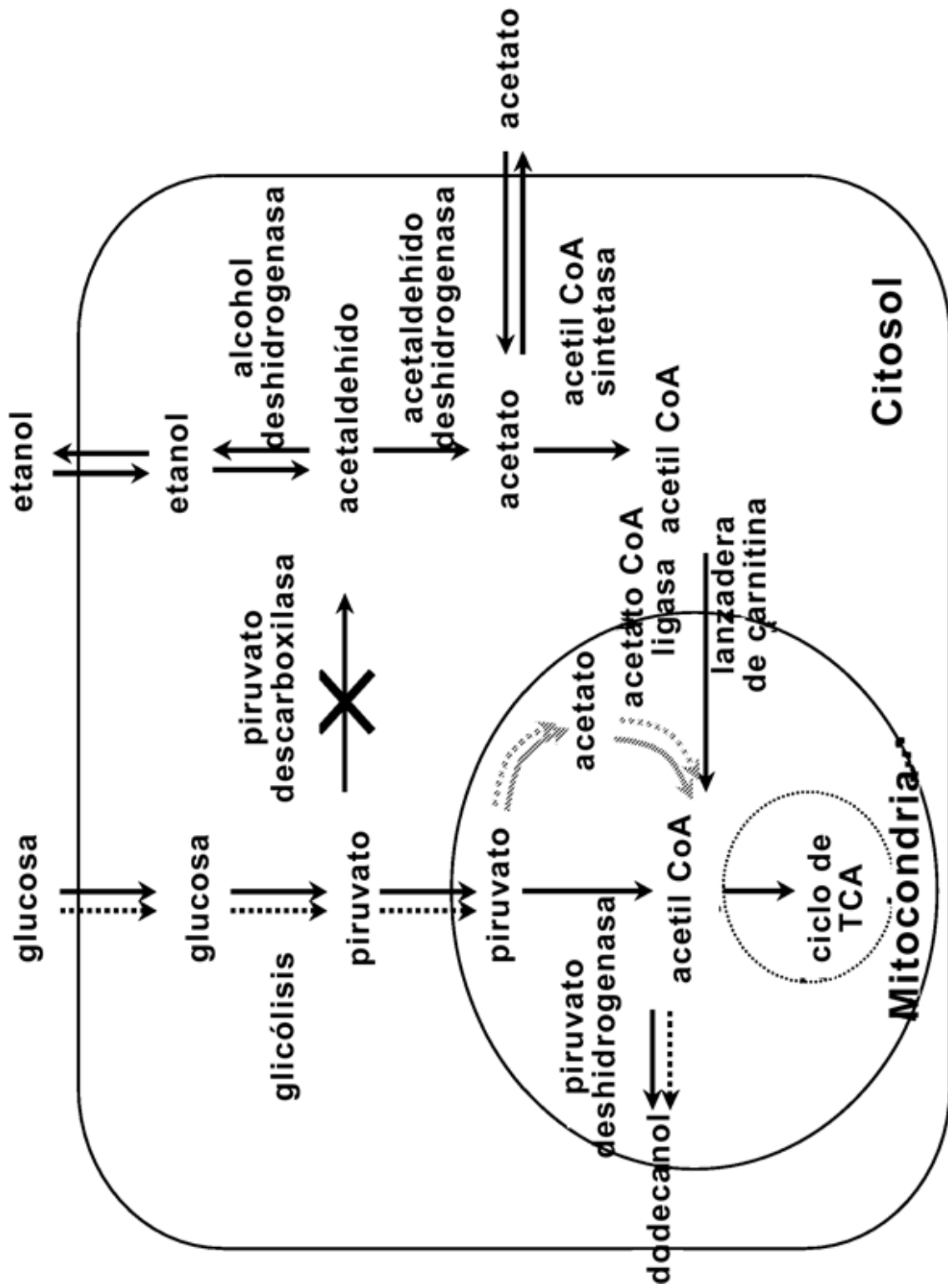


Figura 20