

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 226**

51 Int. Cl.:

C12N 1/15 (2006.01)

C12P 5/00 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2015 PCT/US2015/024181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153929**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2015 E 15774454 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3105313**

54 Título: **Un módulo de válvula de purga molecular bioquímico sintético que mantiene el equilibrio de cofactores**

30 Prioridad:

02.04.2014 US 201461974311 P

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

09.10.2020

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**BOWIE, JAMES, U.;
OPGENORTH, PAUL, H. y
KORMAN, TYLER, P.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 786 226 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

Un módulo de válvula de purga molecular bioquímico sintético que mantiene el equilibrio de cofactores

5 **Campo técnico**

La divulgación proporciona rutas diseñadas mediante ingeniería genética para la producción química usando un sistema de purga molecular que equilibra los cofactores.

10 **Antecedentes**

El mayor beneficio ambiental potencial de la ingeniería metabólica sería la producción de productos químicos de bajo valor/alto volumen, tales como biocombustibles. Sin embargo, los altos rendimientos requeridos para la viabilidad económica de los productos químicos de bajo valor son particularmente difíciles de lograr en microbios debido a la miríada de rutas bioquímicas en competición, necesarias para la viabilidad celular.

Korman et al., divulgan un sistema bioquímico sintético para la producción *in vitro* de isopreno a partir de intermedios de la glucólisis (Protein Science, vol. 23, n.º 5, 12 de marzo de 2014, páginas 576-585). Satoh et al., divulgan la síntesis de poli(3-hidroxi-butarato) catalizada por enzimas a partir de acetato con recirculación de CoA y regeneración de NADPH *in vitro* (Journal of Bioscience and Bioengineering, vol 95, n.º 4, 1 de enero de 2003, páginas 335-341). Heux et al., divulgan la ingeniería de cofactores en *Saccharomyces cerevisiae*: expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism (Metabolic Engineering, vol. 8, n.º4, 1 de julio de 2006, páginas 303-314).

25 **Sumario**

La presente invención proporciona una ruta metabólica recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética que comprende una pluralidad de etapas enzimáticas que convierten un sustrato en un producto, en la que la ruta incluye una producción desequilibrada y la utilización de un cofactor de la ruta que comprende: una primera enzima dependiente de cofactores que puede convertir un primer sustrato en un segundo sustrato, dicha enzima da lugar a la producción desequilibrada y a la utilización de un primer cofactor; una segunda enzima dependiente de cofactores que también puede convertir el primer sustrato en el segundo sustrato, en la que la segunda enzima dependiente de cofactores es un mutante de la primera enzima dependiente de cofactores que se ha modificado para tener su preferencia de cofactores alterada hacia un segundo cofactor; y una enzima que recicla el primer cofactor, en la que el primer cofactor comprende NAD⁺/NADH y el segundo cofactor comprende NADP⁺/NADPH, y en la que la ruta comprende una NADH deshidrogenasa, una NADPH deshidrogenasa que es una NADH deshidrogenasa mutante que utiliza NADP⁺ en vez de NAD⁺, y una NADH oxidasa.

En una realización de lo anterior, la NADH deshidrogenasa es un complejo de una NADH piruvato deshidrogenasa. En una realización adicional, el complejo de la NADH piruvato deshidrogenasa comprende una subunidad a de la piruvato deshidrogenasa, una subunidad b de la piruvato deshidrogenasa, una dihidrolipoamida acetiltransferasa, y una dihidrolipoamida deshidrogenasa. En una realización adicional más, la subunidad a de la piruvato deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:1, en la que la subunidad b de la piruvato deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:2, en la que la dihidrolipoamida acetiltransferasa es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:3, y en la que la dihidrolipoamida deshidrogenasa es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:5, en la que el complejo convierte el piruvato en acetil-CoA. En una realización adicional más, la NADPH deshidrogenasa es un complejo de una NADPH piruvato deshidrogenasa mutante que utiliza NADP⁺. En una realización adicional, el complejo de la NADPH piruvato deshidrogenasa comprende una subunidad a de la piruvato deshidrogenasa, una subunidad b de la piruvato deshidrogenasa, una dihidrolipoamida acetiltransferasa, y una dihidrolipoamida deshidrogenasa mutante que utiliza preferentemente NADP⁺. En otra realización, la subunidad a de la piruvato deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:1, en la que la subunidad b de la piruvato deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:2, en la que la dihidrolipoamida acetiltransferasa es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:3, y en la que la dihidrolipoamida deshidrogenasa es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:7 y utiliza preferentemente NADP⁺, en la que el complejo convierte el piruvato en acetil-CoA. En otras realizaciones adicionales, la NADH oxidasa es una NoxE o una homóloga de la misma. En una realización adicional, la NADH oxidasa comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:10. En otra realización de cualquiera de las anteriores, la ruta es un sistema exento de células. En otra realización adicional, la ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética produce PHB. En otra realización más, la ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética produce isopreno.

La presente descripción proporciona un sistema enzimático que comprende una ruta metabólica que incluye una pluralidad de enzimas para convertir un sustrato en un producto, teniendo la ruta metabólica una utilización desequilibrada de cofactores reductores/oxidantes, en la que el sistema enzimático comprende una válvula de purga metabólica que comprende una NADH piruvato deshidrogenasa, y una NADPH piruvato deshidrogenasa y una NADH/NADPH oxidasa.

Se describe también en el presente documento un microorganismo recombinante que comprende una NADH piruvato deshidrogenasa heteróloga, una NADPH piruvato deshidrogenasa y una NADH y/o NADPH oxidasa.

La descripción proporciona también un polipéptido recombinante que comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 5 y que comprende las mutaciones E206V, G207R, A208K, y S213R. En una realización, el polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO:7.

La descripción proporciona también un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 5 y que comprende las mutaciones E206V, G207R, A208K, y S213R. En un ejemplo adicional, el polinucleótido codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 7. En un ejemplo adicional, el polinucleótido comprende una secuencia que es un 70-90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:6 y codifica un polipéptido de la SEQ ID NO:7.

La descripción proporciona también una ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética que convierte un sustrato en un producto deseado, en la que la ruta incluye una producción desequilibrada y la utilización de un cofactor de la ruta que comprende una primera etapa metabólica que produce un primer cofactor reducido y una segunda etapa metabólica que oxida el primer cofactor reducido, en la que la ruta comprende la ruta de una válvula de purga que recircula un segundo cofactor reducido. En un ejemplo, el primer cofactor reducido comprende NADPH y el segundo cofactor reducido comprende NADH. En un ejemplo adicional, la ruta de la válvula de purga comprende una NADH deshidrogenasa y una NADH oxidasa. En un ejemplo más adicional, la NADH deshidrogenasa es una NADH piruvato deshidrogenasa. En otro ejemplo, el primer cofactor reducido comprende NADH y el segundo cofactor reducido comprende NADPH. En otro ejemplo más, la ruta de la válvula de purga comprende una NADPH deshidrogenasa y una NADPH oxidasa. En un ejemplo adicional, la NADPH deshidrogenasa es una NADPH piruvato deshidrogenasa. En otro ejemplo de cualquiera de los anteriores la ruta produce isopreno a partir de piruvato. En otro ejemplo más de cualquiera de los anteriores la ruta produce PHB.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se muestran en los dibujos acompañantes y en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran una o más realizaciones de la divulgación y, junto con la descripción detallada, sirven para explicar los principios y las implementaciones de la invención.

La **Figura 1A-C** muestra un sistema de una válvula de purga bioquímica sintética para la producción de PHB. **(A)** La ruta metabólica *in vitro* para la conversión del piruvato a PHB. La ruta comprende 6 reacciones separadas: reacción 1 (PDH^{NADH}), reacción 2 ($\text{PDH}^{\text{NADPH}}$), reacción 3 (NoxE), reacción 4 (PhaA), reacción 5 (PhaB), reacción 6 (PhaC). La válvula de purga está destacada en la ruta recuadrada. **(B)** Cómo se diseña la válvula de purga para que funcione. A bajo NADPH (alto NADP^+), $\text{PDH}^{\text{NADPH}}$ domina la reacción, generando Acetil-CoA y NADPH a partir de piruvato y NADP^+ . La válvula de purga está eficazmente "cerrada". En condiciones de alta concentración de NADPH (baja concentración de NADP^+), se realiza una privación de la enzima $\text{PDH}^{\text{NADPH}}$ por el cofactor oxidado, suprimiendo la ruta de la Acetil-CoA. En esta situación, se hace cargo el sistema $\text{PDH}^{\text{NADPH}}$ /NoxE, produciendo Acetil-CoA; la válvula de purga está "abierta". **(C)** Un esquema de ingeniería química ilustrativo del sistema de la válvula de purga usando en la producción de PHB a partir de piruvato, que implica un bucle de recirculación de cofactores.

La **Figura 2** muestra el diseño de la enzima $\text{PDH}^{\text{NADPH}}$. Las estructuras de la subunidad E3 de *G. stearothermophilus* natural (E3, traza de la estructura principal) se muestran superpuestas sobre la estructura de la glutatión reductasa de *E. coli* (GTX-NADPH, traza de la estructura principal en gris). El sustrato NADPH de la glutatión transferasa se muestra con una representación de palos, mostrando la colocación del resto fosfato que necesita acomodarse. Se muestran los restos cambiados para aceptar el fosfato (E206V, G207R, A208K, y S213R).

La **Figura 3** muestra la producción de PHB usando un sistema optimizado. En esta reacción, la producción de PHB se controla por un aumento de A_{600} producido mediante precipitación de los gránulos de PHB. No se observa aumento en la ausencia de la polimerasa PHB, PhaC. Se confirmó la producción de PHB mediante un ensayo de cromatografía de gases. La A_{340} controla el nivel de NADPH ya que no se deja que NADH se acumule debido a la presencia de NoxE. El sistema de la válvula de purga mantiene un alto nivel de NADPH a lo largo de

la reacción.

La **Figura 4** muestra un curso temporal de la reacción de optimización del piruvato a PHB utilizando relaciones subóptimas de $\text{PDH}^{\text{NADPH}}$ y PDH^{NADH} . Las trazas de A_{340} , controlan los niveles de NADPH que se encuentran en tres fases distintas. Una reducción inicial rápida de NADPH por el $\text{PDH}^{\text{NADPH}}$ va seguida por una oxidación lenta del NADPH por PhaB a medida que aumentan los niveles intermedios. A medida que la reacción procede, la válvula de purga se cierra y los niveles de NADPH aumentan de nuevo. La evolución del sistema coincide con el aumento en A_{600} que representa la precipitación de los gránulos de PHB de la solución.

La **Figura 5A-B** muestra que el sistema de la válvula de purga es robusto. **(A)** El gráfico muestra un rendimiento relativo de PHB tras el inicio con diferentes cantidades de cada uno de los cofactores. Los rendimientos relativos representan la relación de la A_{600} final para la reacción, con respecto a la A_{600} final para la reacción optimizada. Todas las reacciones muestran un rendimiento relativamente robusto en comparación con el control negativo que carece de la enzima phaC final (barra naranja). Las barras de error reflejan la desviación estándar de las tres reacciones independientes. **(B)** Tabla de los números reflejados en el gráfico en la parte A.

La **Figura 6A-B** muestra el empleo de la válvula de purga para la producción de isopreno. **(A)** La ruta metabólica *in vitro* para la conversión del piruvato a isopreno. La válvula de purga destacada en el recuadro comprende las mismas enzimas/reacciones que en la Fig. 1A. En la ruta del mevalonato, se usan 3 Acetil-CoA para preparar HMG-CoA (enzimas 6 y 7). HMG-CoA se reduce por HMGR (enzima 8) con 2 NADPH para dar mevalonato. A continuación se usan 3 ATP para convertir el mevalonato en pirofosfato de isopentenilo seguido por la producción de isopreno (enzimas 9-12). **(B)** El gráfico muestra la dependencia de la producción de isopreno de la válvula de purga. No se usó válvula de purga en la primera reacción (PDH^{NADH} , NADPH, NoxE). Se añadió simplemente NADPH y se recirculó NADH usando NoxE. El experimento final (PDH^{NADH} , $\text{PDH}^{\text{NADPH}}$, NoxE) muestra los resultados que emplea el sistema de válvula de purga. Dejar fuera cualquier componente del sistema de la válvula de purga dio como resultado drásticas disminuciones en la producción de isopreno. Cada reacción se llevó a cabo por duplicado.

La **Figura 7** muestra la estabilidad de las enzimas GsPDH. Las enzimas se incubaron a una temperatura dada durante 1 hora y a continuación se evaluaron inmediatamente para la actividad.

La **Figura 8** muestra la estabilidad del sistema PHB a temperatura ambiente. Se mezclaron todos los componentes del sistema optimizado, dejando fuera el piruvato y a continuación el sistema se incubó a temperatura ambiente. La reacción se inició en varios momentos mediante la adición del piruvato y se controló la extensión de la reacción mediante la DO_{600} . El gráfico muestra el porcentaje de extensión de la reacción conseguido para cada tiempo de preincubación.

Descripción detallada

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "y", y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un polinucleótido" incluye una pluralidad de dichos polinucleótidos y la referencia a "la enzima" incluye la referencia a una o más enzimas, y así sucesivamente.

A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia a la cual pertenece esta divulgación. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de los métodos y composiciones divulgados, se describen en el presente documento métodos, dispositivos y materiales ilustrativos.

Además, el uso de "o" significa "y/o" a no ser que se indique otra cosa. De forma similar, "comprenden", "comprende", "que comprende" "incluye", "incluye", y "que incluye", son indistintos y no se pretende que sean limitantes.

Debe entenderse además que, cuando las descripciones de diversas realizaciones utilizan el término "que comprende", los expertos en la materia entenderán que, en algunos casos específicos, una realización puede describirse alternativamente utilizando el lenguaje "consiste esencialmente en" o "consiste en".

Cualquier publicación descrita anteriormente y a través del texto se proporciona únicamente para su publicación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteponer dichas publicaciones en virtud de la divulgación anterior.

Como se usa en el presente documento, una "actividad" de una enzima es una medida de su capacidad para catalizar una reacción que da como resultado un metabolito, es decir, para "funcionar", y puede expresarse como la velocidad a la que se produce el metabolito de la reacción. Por ejemplo, la actividad enzimática se puede representar como la cantidad de metabolito producido por unidad de tiempo o por unidad de enzima (por ejemplo, concentración o peso), o en términos de afinidad o constantes de disociación.

El término "ruta biosintética", denominado también "ruta metabólica", se refiere a un conjunto de reacciones bioquímicas anabólicas o catabólicas para convertir (transmutar) una especie química en otras. Los productos

génicos pertenecen a la misma "ruta metabólica" si ellos, en paralelo o en serie, actúan sobre el mismo sustrato, producen el mismo producto, o actúan o producen un intermedio metabólico (es decir, metabolito) entre el mismo sustrato y el producto final del metabolito. La divulgación proporciona rutas biosintéticas *in vitro* que comprenden una válvula de purga metabólica y también proporcionan un microorganismo recombinante que tiene una ruta diseñada mediante ingeniería metabólica que comprende una válvula de purga metabólica para la producción de un producto o intermedio deseado.

Como se usa en el presente documento, un "cofactor" se refiere generalmente a un compuesto o metabolito químico que es necesario para la actividad biológica de una proteína. Estas proteínas son comúnmente enzimas, y los cofactores ayudan en las transformaciones bioquímicas. Los cofactores incluyen, aunque no de forma limitativa, uno o más iones inorgánicos, o un complejo orgánico o una molécula metaloorgánica denominada algunas veces coenzima; la mayoría de las cuales se derivan de vitaminas y de los nutrientes orgánicos requeridos en pequeñas cantidades. Algunas enzimas o complejos de enzimas requieren algunos cofactores. Por ejemplo, el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa en la unión de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico requieren cinco cofactores orgánicos y un ion metálico: débilmente unidos al pirofosfato de tiamina (TPP), la lipoamida unida covalentemente y el flavina adenina dinucleótido (FAD), y los cosustratos nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y la coenzima A (CoA), y un ion metálico (Mg²⁺). Los cofactores orgánicos son a menudo vitaminas o se preparan a partir de vitaminas. Pueden contener el nucleótido adenosina monofosfato (AMP) como parte de sus estructuras, tales como ATP, coenzima A, FAD, y NAD⁺.

Una "enzima" significa cualquier sustancia, compuesta normalmente completamente o en última instancia por aminoácidos que forman una proteína o polipéptido que cataliza o promueve, más o menos específicamente, una o más reacciones químicas o bioquímicas.

El término "expresión" con respecto a un gen o polinucleótido se refiere a la transcripción del gen o el polinucleótido y, según sea apropiado, la traducción del transcrito de ARNm resultante en una proteína o polipéptido. Así, como será evidente según el contexto, la expresión de una proteína o polipéptido da como resultado la transcripción y la traducción del marco de lectura abierto.

Un "metabolito" se refiere a cualquier sustancia producida por el metabolismo o una sustancia necesaria o que participa en un proceso metabólico concreto que proporciona un metabolito, una sustancia química, alcohol o cetona deseados. Un metabolito puede ser un compuesto orgánico que es un material de partida (por ejemplo, un carbohidrato, un fosfato azucarado, piruvato, etc.), un intermedio en (por ejemplo, acetil-CoA), o un producto final (por ejemplo, isopreno o PHB) del metabolismo. Los metabolitos se pueden usar para construir más moléculas complejas, o se pueden descomponer en unas más simples. Se pueden sintetizar metabolitos intermedios a partir de otros metabolitos, usados quizá para preparar sustancias más complejas, o descomponer en compuestos más simples, a menudo con la liberación de energía química.

Como se usa en el presente documento, la expresión "diseñado mediante ingeniería metabólica" o "diseño mediante ingeniería metabólica" implica un diseño de ruta racional y un ensamblaje de genes biosintéticos, de genes asociados con operones, y elementos de control de dichos polinucleótidos, para la producción de un metabolito deseado, tal como acetil-CoA, alcoholes superiores u otras sustancias químicas, en un microorganismo o *in vitro*. "Diseñado mediante ingeniería metabólica" puede incluir además la optimización del flujo metabólico mediante la regulación y la optimización de la transcripción, traducción, estabilidad de la proteína y funcionalidad de la proteína usando el diseño mediante ingeniería genética y una condición de cultivo adecuada que incluye reducción, perturbación, o desactivación genética de, una ruta metabólica competidora que compite con un intermedio que lleva a una ruta deseada. Un gen biosintético puede ser heterólogo para el microorganismo hospedador, tanto por ser extraño para el hospedador como por haberse modificado mediante mutagénesis, recombinación y/o asociación con una secuencia de control de la expresión heteróloga en una célula hospedadora endógena. En una realización, donde el polinucleótido es xenogénico para el organismo hospedador, el polinucleótido puede estar optimizado para el codón.

Una "válvula de purga metabólica" se refiere a una ruta metabólica diseñada mediante ingeniería genética que 'purga' los metabolitos y cofactores en exceso resultantes de la recirculación del metabolito o cofactor para su uso en una ruta metabólica primaria.

Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" o "ácido nucleico recombinante" se refieren a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN), y, en su caso, ácido ribonucleico (ARN).

Una "proteína" o "polipéptido", términos que se usan indistintamente en el presente documento, comprende una o más cadenas de bloques componentes químicos denominados aminoácidos que están unidos entre sí por enlaces químicos llamados enlaces peptídicos. Una proteína o polipéptido puede funcionar como una enzima.

Las expresiones "microorganismo recombinante" y célula hospedadora recombinante se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a microorganismos que se han modificado genéticamente para expresar o expresar en exceso polinucleótidos endógenos, o para expresar secuencias no endógenas, tales como las incluidas

en un vector. El polinucleótido codifica generalmente una enzima diana implicada en una ruta metabólica para producir un metabolito deseado como se describe en el presente documento, pero puede incluir también factores de proteínas necesarios para la regulación o la actividad o la transcripción. Por consiguiente, los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento se han diseñado mediante ingeniería genética para expresar o
 5 expresar en exceso enzimas diana que no se han expresado o expresado en exceso previamente por un microorganismo parental. Se entiende que las expresiones "microorganismo recombinante" y "célula hospedadora recombinante" no se refieren solo al microorganismo recombinante concreto sino a la progenie o a la progenie potencial de dicho microorganismo.

10 El término "sustrato" o "sustrato adecuado" se refiere a cualquier sustancia o compuesto que se convierte o se entiende que se convierte en otro compuesto mediante la acción de una enzima. El término incluye no solo un compuesto individual, sino también combinaciones de los compuestos, tales como soluciones, mezclas y otros materiales que contienen al menos un sustrato, o sus derivados. Además, el término "sustrato" abarca no solo compuestos que proporcionan una fuente de carbono adecuada para usar como material de partida, sino también
 15 metabolitos intermedios y metabolitos de productos finales usados en una ruta como se describe en el presente documento. Además, un sustrato puede ser un cofactor oxidado o reducido o un factor que está fosforilado o desfosforilado.

20 Se han empleado el diseño mediante ingeniería metabólica y la biología sintética para la producción de sustancias químicas de alto valor pero que no han tenido tanto éxito como se esperaba en satisfacer las rigurosas restricciones económicas de la fabricación a gran escala de productos químicos. Los sistemas microbianos están a menudo limitados por una variedad de desafíos técnicos que dificultan alcanzar un coste competitivo, incluyendo malos rendimientos debidos a rutas competitivas; baja productividad producida por tasas de crecimiento lentas o dificultades en la optimización de la ruta; crecimiento microbiano contaminante; toxicidad del producto; y aislamiento del producto caro.

25 Una estrategia que está comenzando a captar la atención es llevar a cabo transformaciones bioquímicas complejas utilizando mezclas de enzimas en un recipiente de reacción o sistema de flujo más bien que en una célula. Construir rutas únicas y dedicadas *in vitro* puede eliminar reacciones secundarias que se producen en la célula, de tal manera que son posibles rendimientos de casi el 100 % y tiempos de reacción rápidos. Los sistemas bioquímicos *in vitro* permiten también un control más preciso sobre la optimización y los problemas de toxicidad del producto se pueden diagnosticar y mitigar más fácilmente. Además, la extracción del producto puede ser más fácil.

30 Tradicionalmente, se ha relegado la construcción de la ruta *in vitro* a su uso como de investigación o en aplicaciones que requieren solo 1-3 enzimas para la producción de compuestos quíricos y otras sustancias químicas de alto valor. Mejoras en la expresión de las proteínas y el acceso a enzimas estables han posibilitado sistemas más complejos. Se han notificado sistemas de biotransformación *in vitro* en los últimos años que implican sistemas de aproximadamente treinta enzimas. Uno de los primeros estudios modernos en este campo fue una ruta artificial que producía hidrógeno a partir de almidón. El concepto se adelantó recientemente con un sistema creativo que generaba hidrógeno a partir de celobiosa con rendimientos próximos al 100 %. En otro esfuerzo, se expresaron heterológamente enzimas de la glucólisis hipertermófilas, que se purificaron térmicamente y se ensamblaron para convertir la glucosa en n-butanol con un rendimiento del 82 %. En otro estudio, se construyó una ruta de Entner-Doudoroff no fosforilativa elegantemente simplificada a partir de archaea hipertermófilas para producir etanol e isobutanol con rendimientos ~55 %. Estos estudios pioneros ilustran la flexibilidad de la bioquímica sintética y el
 45 potencial para altos rendimientos.

50 El mantenimiento de un correcto equilibrio de cofactores es una parte esencial de la generación de flujo y proporciona una fuerza de impulsión adecuada a través de una ruta enzimática. *In vivo*, la especificidad enzimática por los cofactores NADH y NADPH se usa normalmente para controlar el flujo de carbono a través de las rutas catabólica y anabólica respectivamente. Los organismos normalmente detectan el estado de reducción de estos cofactores y utilizan esta información para regular positiva o negativamente las rutas catabólicas y anabólicas para hacer frente a los cambios ambientales. Los sistemas *in vitro*, sin embargo, no tienen la mirada de rutas periféricas que facilitan este control. Además, las especificidades anabólicas y catabólicas naturales de NADH y NADPH complican las biotransformaciones *in vitro*. Los sistemas bioquímicos sintéticos a menudo se han ocupado de estos
 55 problemas mediante consideraciones cuidadosas de la estequiometría de cofactores en el diseño de la ruta, mediante el uso de metabolitos propiciatorios caros, enzimas rediseñadas genéticamente de forma que se necesite solo un único tipo de cofactor, añadir cofactores en exceso, o añadir constantemente intermedios a la mezcla de reacción para sostener el proceso.

60 Aunque los métodos, composiciones y sistemas descritos en el presente documento se describen con referencia a determinados productos metabólicos, los métodos, composiciones y sistemas son aplicables a una amplia gama de rutas bioquímicas recombinantes en donde es importante la recirculación de cofactores. En una ruta diseñada mediante ingeniería genética ilustrativa, la divulgación describe la producción de polihidroxitiratos (PHB) y polihidroxicanoatos (PHA). En otra realización ilustrativa, la divulgación describe la producción de isopreno. Ambas realizaciones utilizan un sistema de válvula de purga molecular de la divulgación para mantener el equilibrio de
 65 cofactores adecuado.

Los PHB y otros PHA son sustancias termoplásticas biodegradables. Los PHA pueden tener características similares a muchos polímeros derivados de sustancias petroquímicas populares, pero son no tóxicos y biodegradables, por tanto, estas composiciones están atrayendo atención creciente como una posible alternativa verde a polímeros basados en el petróleo en una amplia gama de aplicaciones. El polímero PHA mejor caracterizado y más abundante es polihidroxibutirato (PHB) que se produce naturalmente a partir de Acetil-CoA como un mecanismo de almacenamiento de carbono y energía en muchos organismos. En la actualidad, la producción industrial de PHB se lleva a cabo en procesos de cultivos discontinuos *in vivo* con privación de nutrientes. Este proceso consume normalmente mucho tiempo, requiere grandes volúmenes de fermentación, y requiere métodos caros para la extracción del PHB. Intentos previos para producir bioplástico *in vitro* han requerido la adición de sustratos propiciatorios y un exceso molar de cofactores para convertir el acetato en PHB.

El isopreno es una plataforma química para una amplia variedad de productos, pero se emplea principalmente en la producción de caucho sintético. La ruta isoprenoide proporciona también precursores para aproximadamente 25.000 biomoléculas conocidas incluyendo fármacos tales como taxol y biocombustibles potenciales. Se han realizado numerosos esfuerzos para producir isopreno en microorganismos y el menor rendimiento notificado es del 28 % de glucosa. Korman et al. (Protein Sci., 23(5):576-85, mayo de 2014), mostró que el sistema bioquímico sintético podría producir isopreno con un rendimiento >95 % a partir de piruvato siempre que se añadieran cofactores de alta energía. Los ejemplos de isoprenoides que se pueden producir mediante los métodos, composiciones y sistemas de la divulgación se seleccionan entre el grupo que consiste de un hemiterpeno, monoterpeneo, diterpeno, triterpeno, tetraterpeno, sesquiterpeno, y politerpeno. Por ejemplo, se puede seleccionar el isoprenoide a partir del grupo que consiste en abietadieno, amorfadieno, careno, α -farneseno, β -farneseno, geraniol, geranilgeraniol, isopreno, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, pachulol, β -pineno, sabineno, γ -terpineno, terpinoleno, y valenceno.

La divulgación describe un sistema de válvula de purga para equilibrar cofactores en rutas *in vitro* para la producción química y en sistemas *in vivo*. Por ejemplo, la divulgación describe una ruta para convertir el piruvato en PHB que mantiene sostenible el equilibrio de cofactores reductores, sin el requerimiento de una correspondencia estequiométrica perfecta de generación de cofactores y la utilización para el uso del carbono. Además, la divulgación describe el uso del sistema de válvula de purga molecular en otras rutas. Por ejemplo, la divulgación demuestra el sistema de válvula de purga que se puede usar como la base para la producción de otros productos derivados de Acetil-CoA aplicando esto a la producción de isopreno a partir de piruvato mediante la ruta del mevalonato. Así, los módulos reguladores descritos en el presente documento pueden liberarnos de tener que equilibrar perfectamente la utilización del equilibrio de cofactores cuando se diseñan sistemas bioquímicos sintéticos.

La divulgación proporciona un nódulo de control robusto para equilibrar la producción y el consumo de cofactores tales como NADPH y NADH de una manera autorregulante y autoequilibrante. Esta ruta *in vitro* mantiene el equilibrio de cofactores sin requerir adherencia a la estequiometría en la generación y utilización de cofactores que aseguran el flujo de carbono. Debido en parte a que el sistema puede sostener altos niveles de NADPH, impulsando la transformación hasta casi su finalización, convirtiendo por ejemplo, el piruvato a cualquiera de PHB o isopreno en casi un 100 % del rendimiento teórico. Además, los altos rendimientos en el sistema son robustos hasta variaciones de 10 veces en los niveles de cofactores.

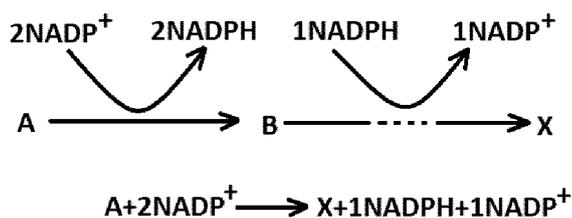
En última instancia, los métodos y composiciones de la divulgación pueden expandirse para incorporar la conversión de sustratos de coste bajo tales como glucosa u otros azúcares en piruvato, que implicarían la ruta de la glucólisis o partes de la ruta de la glucólisis. Por tanto, se ha demostrado anteriormente un sistema bioquímico sintético que emplea la glucólisis. Construyendo compuestos más complejos a partir de Acetil-CoA tales como ácidos grasos, policétidos, y otros isoprenoides que incorporan el uso y la recirculación del ATP. En dichos casos, desarrollar sistemas reguladores similares a la válvula de purga empleada aquí, liberará al diseño del sistema bioquímico sintético de tener que consumir cofactores de alta energía durante la fase anabólica en perfecto equilibrio estequiométrico. Así, la estrategia puede ayudar a diversificar las dianas químicas de la bioquímica sintética.

La biotransformación del piruvato en PHB, ilustra un problema básico de desequilibrio de cofactores que se encuentra en los sistemas bioquímicos. En particular, la conversión del piruvato en Acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH) da como resultado una molécula de NADH. Sin embargo, la ruta de las tres enzimas (phaA, B, y C) a PHB a partir de Acetil-CoA utiliza solo una mitad de una molécula de NADPH por Acetil-CoA. Así, la ruta convencional produce un exceso de equivalentes reductores. Además, los equivalentes reductores son del tipo fuerte (NADH más bien que NADPH). La divulgación ilustra el sistema de válvula de purga en una ruta para la regulación del NAD y del NADP y sus equivalentes reducidos, como se muestra en la FIG. 1A, que puede generar el cofactor correcto y regular su producción.

En el diseño, se desarrolló una "válvula de purga bioquímica sintética que desacopla eficazmente la producción estequiométrica del NAD(P)H a partir del Acetil-CoA (Fig. 1). A este fin, se utilizó una mezcla de un PDH natural que utiliza NAD^+ (PDH^{NADH}), un PDH mutante que utiliza NADP^+ ($\text{PDH}^{\text{NADPH}}$), y una NADH generadora de agua (NoxE) que oxida específicamente NADH, pero no NADPH. Al emplear este nodo metabólico, se generó NADPH para la producción de PHB a partir de piruvato, pero también disipa los equivalentes reductores en exceso de una manera

autorreguladora. Tal como se ilustra en la Fig. 1B, en condiciones de una baja concentración de NADPH, una alta concentración de NADP⁺, el PDH^{NADPH} mutante puede funcionar para generar Acetil-CoA y restaurar los niveles de NADPH. En condiciones de una alta concentración de NADPH, una baja concentración de NADP⁺, la actividad del PDH^{NADPH} se cortará automáticamente y el PDH^{NADH} natural se usará preferentemente para producir Acetil-CoA y NADH. En esta condición de alta concentración de NADPH, no se necesitan equivalentes reductores. Debido a que los equivalentes reductores se producen en la forma de NADH y no de NADPH, se eliminan por una oxidasa, NoxE. La presencia de NoxE asegura que el NADH nunca se acumula y el PDH^{NADH} puede funcionar ya para generar carbono para la ruta PHB en la forma de Acetil-CoA. El sistema PDH^{NADH}/ PDH^{NADPH}/ NoxE actúa de la misma forma que una válvula de purga que se abre en condiciones de una alta concentración de NADPH para aliviar la "presión" de los equivalentes reductores en exceso (es decir, la acumulación de NADH) y permite mantener el flujo de carbono. En la Fig. 1C se muestra un esquema de diseño de ingeniería del sistema de la válvula de purga.

Por ejemplo, la divulgación demuestra que para construir un sistema *in vitro*, se adquirieron las enzimas comercialmente o purificadas, se ensayaron para la actividad, y se mezclaron juntas en un tampón de reacción seleccionado adecuadamente. El sistema comprende un conjunto de un núcleo de enzimas para el sistema de la "válvula de purga" y un conjunto secundario de enzimas para la síntesis de una sustancia química deseada o biocombustible. El sistema de la válvula de purga del núcleo puede utilizarse en combinación con cualquier sistema *in vitro* que convierta un conjunto de metabolitos (por ejemplo, una primera fuente de carbono) en un segundo metabolito (por ejemplo, un producto químico deseado), en el que la ruta metabólica secundaria (por ejemplo, la ruta del producto) utiliza y/o produce metabolitos de cofactores en exceso (por ejemplo, produce equivalentes reductores en exceso). En dichos casos, se puede utilizar un sistema de válvula de purga para equilibrar los cofactores. Por ejemplo, en el caso de PHB e isopreno, estos equivalentes reductores se pueden utilizar y optimizar. En una realización, la ruta metabólica produce un exceso de un equivalente reductor que es necesario para la producción del producto deseado. Por ejemplo, en el Esquema 1, a continuación, una primera etapa metabólica produce equivalentes reductores y una segunda etapa metabólica utiliza los equivalentes reductores, sin embargo, la segunda etapa utiliza solo una fracción de los equivalentes reductores producidos en la primera etapa. Así, en un sistema cerrado, el factor limitante serán los equivalentes reductores.



Esquema 1

Tras la utilización del NADP⁺ disponible en el esquema 1, por ejemplo, el sistema se detendría y no fabricaría más metabolitos ("B" o "X"). Sin embargo, en el sistema de la válvula de purga de la divulgación, una ruta secundaria que puede oxidar los equivalentes reductores llegaría a ser activa y permitiría la producción de A a B, permitiendo por tanto a la vez el uso del NADPH en las etapas B a X. Una vez que está presente suficiente NADP⁺, a continuación, la ruta metabólica de A a B utilizaría el NADP⁺.

En una realización, la válvula de purga para su uso en un sistema *in vitro* comprende: una combinación de una enzima NADH⁻ deshidrogenasa y una NADPH-deshidrogenasa y una NADH o NADPH-oxidasa. En una realización, el sistema de la válvula de purga comprende un complejo de una NADH-piruvato deshidrogenasa, un complejo de una NADPH-piruvato deshidrogenasa y una NADH-oxidasa. debe señalarse que se pueden usar otras parejas de deshidrogenasas.

El sistema de la válvula de purga de la anterior realización puede utilizarse en combinación con cualquier ruta metabólica que produzca NADH o NADPH y utilice una fracción de lo que se produjo en la producción de un producto deseado. Por ejemplo, se puede usar el sistema de purga en una ruta que convierta en piruvato en acetil-CoA para producir NADH o NADPH y que utiliza NADH o NADPH para producir adicionalmente un metabolito deseado. Las rutas ilustrativas incluyen las rutas del PHB y el isopreno descritas a continuación.

La divulgación proporciona rutas que se pueden desarrollar *in vitro* de numerosos modos. Por ejemplo, Las enzimas deseadas se pueden clonar/diseñarse mediante ingeniería genética en un microorganismo o célula, expresarse y a continuación purificarse a partir del cultivo. En otro ejemplo, las enzimas pueden expresarse, las células alterarse y usarse una preparación alterada en las rutas de la divulgación. En otra realización, las enzimas pueden purificarse y anclarse a un sustrato en un sistema (por ejemplo, en un sistema microfluidico) para su uso en la ruta metabólica. En otra realización más, se pueden clonar las enzimas termófilas que tienen la actividad deseada, expresarse, y las células o las preparaciones de las anteriores calentarse a una temperatura en la que las enzimas deseadas permanecen activas mientras que las enzimas indeseadas se desnaturalizan. En otra realización más, las enzimas pueden adquirirse comercialmente y mezclarse según sea adecuado. En todas las realizaciones anteriores, el

sistema se combinaría con los sustratos y cofactores necesarios (por ejemplo, NAD⁻, NADP⁻, FAD⁻, AMP, ADP, ATP y similares).

5 Por consiguiente, la divulgación proporciona microorganismos "diseñados" o "modificados" mediante ingeniería genética que se producen mediante la introducción de material genético en el microorganismo hospedador o precursor de elección modificando o alterando por tanto la fisiología y la bioquímica celular del microorganismo. Mediante la introducción del material genético el microorganismo precursor adquiere nuevas propiedades, por ejemplo, la capacidad de producir cantidades nuevas, o mayores de, un metabolito intracelular. El material genético introducido en el microorganismo precursor contiene gen(es), o partes de gen(es), que codifican una o más de las 10 enzimas implicadas en una ruta biosintética e incluyen gen(es) o partes de gen(es), que codifican una o más de las enzimas implicadas en la válvula de purga metabólica, la(s) ruta(s) útiles para la producción de un metabolito deseado (por ejemplo, acetil-fosfato y/o acetil-CoA), y pueden incluir también elementos adicionales para la expresión y/o regulación de la expresión de estos genes, por ejemplo, secuencias promotoras.

15 Un microorganismo diseñado o modificado mediante ingeniería genética puede incluir también de manera alternativa o adicionalmente la introducción de un material genético en un microorganismo hospedador o precursor, la alteración, delección o inactivación génica de un gen o polinucleótido para alterar la fisiología celular y la bioquímica del microorganismo. Mediante la reducción, alteración o inactivación génica de un gen o polinucleótido, el microorganismo adquiere propiedades nuevas o mejoradas (por ejemplo, la capacidad de producir cantidades 20 nuevas o mayores de un metabolito intracelular, mejorar el flujo de un metabolito por la vía deseada, y/o reducir la producción de subproductos indeseables). Por ejemplo, puede ser deseable diseñar mediante ingeniería genética un organismo para expresar un conjunto deseado de enzimas en una ruta metabólica eliminando a la vez las enzimas de las rutas competitivas. Este diseño mediante ingeniería genética puede ser aplicable *in vitro* (donde tras la alteración o la purificación, no están presentes las enzimas indeseables) o *in vivo*.

25 Una proteína "nativa" o "natural", enzima, polinucleótido, gen, o célula, significa una proteína, enzima, polinucleótido, gen, o célula de origen natural.

30 Un "microorganismo precursor" se refiere a una célula utilizada para generar un microorganismo recombinante. La expresión "microorganismo precursor" describe, en una realización, una célula que se produce en la naturaleza, es decir, una célula natural que no se ha modificado genéticamente. La expresión "microorganismo precursor" describe además una célula que sirve como "precursora" para el diseño mediante ingeniería genética adicional. En esta última realización, la célula puede haberse diseñado mediante ingeniería genética, pero sirve como fuente para un diseño mediante ingeniería genética adicional.

35 Por ejemplo, un microorganismo natural puede modificarse genéticamente para expresar o expresar en exceso una primera diana enzimática tal como una NADH-piruvato deshidrogenasa. Este microorganismo puede actuar como microorganismo precursor en la generación de un microorganismo modificado para expresar o expresar en exceso una segunda diana enzimática por ejemplo, una NADH-oxidasa. Como se usa en el presente documento, "expresa" o "expresa en exceso" se refiere a la expresión fenotípica de un producto génico deseado. En una realización, un gen que se produce naturalmente en el organismo puede diseñarse mediante ingeniería genética de tal manera que se una a un promotor heterólogo o dominio regulador, en el que el dominio regulador da lugar a la expresión del gen, modificando por tanto su expresión normal relativa al organismo natural. Como alternativa, el organismo puede diseñarse mediante ingeniería genética para eliminar o reducir una función represora en el gen, modificando por 45 tanto su expresión. En otra realización más, un casete que comprende la secuencia génica unida operativamente a un elemento de control/regulador de la expresión deseado se diseña mediante ingeniería genética en el microorganismo.

50 Por consiguiente, un microorganismo precursor funciona como una célula de referencia para los eventos sucesivos de modificación genética. Cada evento de modificación puede llevarse a cabo introduciendo una o más moléculas de ácidos nucleicos en la célula de referencia. La introducción facilita la expresión o la expresión en exceso de una o más enzimas diana o la reducción o eliminación de una o más enzimas diana. Se entiende que el término "facilita" abarca la activación de los polinucleótidos endógenos que codifican una enzima diana mediante la modificación genética de por ejemplo, una secuencia promotora en un microorganismo precursor. Se entiende además que el 55 término "facilita" abarca la introducción de polinucleótidos exógenos que codifican una enzima diana en un microorganismo precursor.

60 Los polinucleótidos que codifican enzimas útiles para generar metabolitos que incluyen homólogos, variantes, fragmentos, proteínas de fusión relacionadas o equivalentes funcionales de las mismas, se usan en moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que dirigen la expresión de dichos polipéptidos en células hospedadoras adecuadas, tales como células bacterianas o células de levaduras.

65 El listado de secuencias adjuntas a la presente proporciona secuencias de polinucleótidos ilustrativas que codifican polipéptidos útiles en los métodos descritos en el presente documento. Se entiende que la adición de secuencias que no alteran la actividad codificada de una molécula de ácido nucleico, tal como la adición de una secuencia no funcional o no codificante (por ejemplo, etiquetas de poliHIS), es una variación conservativa del ácido nucleico

básico.

Se entiende que un polinucleótido descrito anteriormente incluye "genes" y que las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente incluyen "vectores" o "plásmidos". Por consiguiente, el término "gen", denominado también un "gen estructural" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido concreto que comprende una secuencia de aminoácidos, que comprende toda o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede incluir secuencias de ADN reguladoras (no transcritas), tales como una región promotora o elementos de control de la expresión, que determinan, por ejemplo, las condiciones en las que se expresa el gen. La región transcrita del gen puede incluir regiones sin traducir, incluyendo intrones, la región 5' sin traducir (UTR), y 3'-UTR, así como la secuencia de codificación.

Los expertos en la materia reconocerán que, debido a la naturaleza degenerada del código genético, se pueden usar una variedad de codones que difieren en sus secuencias de nucleótidos para codificar un aminoácido dado. Un polinucleótido o una secuencia génica concreta que codifica una enzima biosintética o polipéptido descrito anteriormente se mencionan en el presente documento meramente para ilustrar una realización de la divulgación, y la divulgación incluye polinucleótidos de cualquier secuencia que codifican un polipéptido que comprende la misma secuencia de aminoácidos de los polipéptidos y proteínas de las enzimas utilizadas en los métodos de la divulgación. De manera similar, un polipéptido puede tolerar normalmente una o más sustituciones, deleciones, e inserciones de aminoácidos en su secuencia de aminoácidos sin pérdida o pérdida significativa de una actividad deseada. La divulgación incluye dichos polipéptidos con secuencias de aminoácidos alternativas, y las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN que se muestran en el presente documento meramente ilustran las realizaciones ilustrativas de la divulgación.

La divulgación proporciona polinucleótidos en la forma de vectores o plásmidos de expresión de ADN recombinante, como se describe con más detalle en otra parte del presente documento, que codifican una o más enzimas diana. En general, dichos vectores pueden tanto replicarse en el citoplasma del microorganismo hospedador como integrarse en el ADN cromosómico del microorganismo hospedador. En cualquier caso, el vector puede ser un vector estable (es decir, el vector sigue estando presente en muchas divisiones celulares, incluso si existe solo presión selectiva) o un vector transitorio (es decir, el vector es perdido gradualmente por los microorganismos hospedadores con números crecientes de divisiones celulares). La divulgación proporciona moléculas de ADN en forma aislada (es decir, no puras, pero existiendo en una preparación en una abundancia y/o concentración que no se encuentra en la naturaleza) y purificadas (es decir, sustancialmente exentas de materiales contaminantes o sustancialmente exentas de materiales que con el ADN correspondiente se encontrarían en la naturaleza).

Un polinucleótido de la divulgación puede amplificarse utilizando ADNc, ARNm o, como alternativa, ADN genómico, como un molde, y cebadores de oligonucleótidos adecuados de acuerdo con las técnicas de amplificación de la PCR convencionales t aquellos procedimientos descritos en la sección de Ejemplos siguiente. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de ADN. Es más, los oligonucleótidos correspondientes a secuencias de nucleótidos pueden prepararse mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado.

Se entiende también que una molécula de polinucleótido aislada que codifica un polipéptido homólogo a las enzimas descritas en el presente documento puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido concreto, de tal manera que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos se introducen en la proteína codificada. Se pueden introducir mutaciones en el polinucleótido mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por la PCR. En contraste con aquellas posiciones donde puede ser deseable realizar una sustitución de aminoácidos no conservativa, en algunas posiciones es preferible realizar sustituciones de aminoácidos conservativas.

Como se entenderá por aquellos expertos en la materia, puede ser ventajoso modificar una secuencia de codificación para mejorar su expresión en un huésped particular. El código genético es redundante con 64 codones posibles, pero la mayoría de organismos utilizan normalmente un subconjunto de estos codones. Los codones que se utilizan con mayor frecuencia en una especie se llaman codones óptimos y los que no se utilizan muy a menudo se clasifican como codones raros o de bajo uso. Los codones se pueden sustituir para reflejar el uso de codones preferido del huésped, un proceso a veces llamado "optimización de codones" o "control del sesgo de codones de especies".

Se pueden preparar secuencias de codificación optimizadas que contienen codones preferidos por un huésped procariota o eucariota concreto (véase también Murray et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17:477-508), por ejemplo, para aumentar la velocidad de traducción o para producir transcritos de ARN recombinante que tengan propiedades deseables, tales como una vida media más larga, en comparación con los transcritos producidos a partir de una secuencia no optimizada. Los codones de terminación de la traducción también pueden modificarse para reflejar las preferencias del huésped. Por ejemplo, los codones de terminación típicos para *S. cerevisiae* y mamíferos son UAA y UGA, respectivamente. El codón de terminación típico para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y *E. coli* utilizan comúnmente UAA como el codón de terminación (Dalphin et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24:

216-218). Se proporciona la metodología para optimizar una secuencia de nucleótidos para la expresión en una planta, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 6.015.891, y las referencias citadas en la anterior.

5 "Transformación" se refiere al proceso por el cual se introduce un vector en una célula hospedadora. La transformación (o transducción, o transfección), puede conseguirse mediante uno cualquiera de numerosos medios que incluyen la electroporación, microinyección, biolística (o administración mediada por bombardeo de partículas), o transformación mediada por agrobacterium.

10 Un "vector" se refiere generalmente a un polinucleótido que se puede propagar y transferir entre organismos, células, o componentes celulares. Los vectores incluyen virus, bacteriófagos, provirus, plásmidos, fagémidos, transposones, y cromosomas artificiales tales como YAC (cromosomas artificiales de levaduras), BAC (cromosomas artificiales bacterianos), y PLAC (cromosomas artificiales de plantas, y similares, que son "episomas", es decir, que se replican autónomamente o se pueden integrar en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector puede ser también un polinucleótido de ARN puro, un polinucleótido de ADN puro, un polinucleótido compuesto de ADN y ARN en la misma hebra, una polilisina conjugada con ADN o ARN, un péptido conjugado a ADN o ARN, un liposoma conjugado a ADN o similar, que no son episómicos en la naturaleza, o pueden ser un organismo que comprende una o más de las anteriores construcciones de polinucleótidos tales como un agrobacterium o una bacteria.

20 Los diversos componentes de un vector de expresión pueden variar ampliamente, dependiendo del uso previsto del vector y de la(s) célula(s) hospedadora(s) en las que se pretende replicar el vector o impulsar la expresión. Los componentes del vector de expresión adecuados para la expresión de los genes y el mantenimiento de los vectores en *E. coli*, levaduras, *Streptomyces*, y otras células usadas comúnmente son ampliamente conocidos y están comercialmente disponibles. Por ejemplo, los promotores adecuados para la inclusión en los vectores de expresión de la divulgación incluyen aquellos que funcionan en microorganismos hospedadores eucariotas o procariotas. Los promotores pueden comprender secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión relativa al crecimiento del microorganismo hospedador o que producen la expresión de un gen para ser activado o desactivado en respuesta a un estímulo químico o físico. Para *E. coli* y determinadas células hospedadoras bacterianas diferentes, se pueden usar promotores derivados de genes para enzimas biosintéticas, enzimas que confieren resistencia a antibióticos, y proteínas de fagos, e incluyen, por ejemplo, la galactosa, lactosa (lac), maltosa, triptófano (trp), beta-lactamasa (bla), bacteriófago lambda PL, y promotores de T5. Además, se pueden usar también promotores sintéticos, tales como el promotor tac (patente de EE.UU n.º 4.551.433). Para los vectores de expresión de *E. coli*, es útil incluir un origen de replicación de *E. coli*, tal como de pUC, p1P, p1, y pBR.

35 Así, los vectores de expresión recombinantes contienen al menos un sistema de expresión, que, a su vez, está compuesto de al menos una porción de secuencias que codifican un gen unidas operativamente a un promotor y opcionalmente secuencias de terminación que funcionan para efectuar la expresión de la secuencia de codificación en células hospedadoras compatibles. Las células hospedadoras se modifican mediante transformación con los vectores de expresión de ADN recombinante de la divulgación para contener las secuencias del sistema de expresión tanto como elementos extracromosómicos como integradas en el cromosoma.

40 Además, y como se ha mencionado anteriormente, los homólogos de las enzimas útiles para generar metabolitos están abarcados por los microorganismos y métodos proporcionados en el presente documento. El término "homólogos" utilizado con respecto a una enzima o gen original de una primera familia o especie se refiere a enzimas o genes distintos de una segunda familia o especie que se determinan por sus análisis funcionales, estructurales o genómicos para ser una enzima o gen de la segunda familia o especie que corresponde a la enzima o gen original de la primera familia o especie. Más a menudo, los homólogos tendrán similitudes funcionales, estructurales o genómicas. Se conocen técnicas por las cuales los homólogos de una enzima o gen pueden clonarse fácilmente utilizando sondas genéticas y la PCR. Se puede confirmar la identidad de las secuencias clonadas como homólogos usando ensayos funcionales y/o mediante cartografiado genómico de los genes.

50 Una proteína tiene "homología" o es "homóloga" a una segunda proteína si la secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína tiene una secuencia similar con la secuencia del ácido nucleico que codifica la segunda proteína. Como alternativa, una proteína tiene homología con una segunda proteína si las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos "similares". (Por tanto, la expresión "proteínas homólogas" se define para significar que las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos similares).

60 Como se usa en el presente documento, dos proteínas (o una región de las proteínas) son sustancialmente homogéneas cuando las secuencias de aminoácidos tienen al menos aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99% de identidad. Para determinar el porcentaje de identidad de las dos secuencias de aminoácidos, o de las dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean a fines comparativos óptimos (por ejemplo, huecos que se pueden introducir en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para la alineación óptima y las secuencias no homólogas se pueden descartar a fines comparativos). En una realización, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines comparativos es al menos del 30 %, normalmente al menos del 40 %, más normalmente al menos del 50 %, incluso más normalmente al menos del 60 %, e incluso más normalmente al menos del 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Se comparan entonces los restos

de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esta posición (como se usa en el presente documento, "identidad" de aminoácido o de ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o de ácido nucleico). el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartido por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesita introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias.

Cuando "homólogo" se usa en referencia a proteínas o péptidos, se reconoce que las posiciones de los restos que no son idénticos difieren a menudo en sustituciones de aminoácidos conservativa. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena secundaria (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservativa no cambia sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de la secuencia o el grado de homología puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Pearson *et al.*, 1994).

En algunos casos, se pueden usar "isozimas" que realizan la misma conversión/reacción funcional, Pero que son de esta manera disimilares en la estructura que se determina normalmente para no ser "homóloga".

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Alanina (A), Valina (V), y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

La homología de secuencias para polipéptidos, que se puede denominar como porcentaje de identidad de la secuencia, se mide normalmente usando un software de análisis de secuencias. Véase, por ejemplo, el Paquete del Software de Análisis de Secuencias del Genetics Computer Group (GCG), University of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wis. 53705. El software de análisis de proteínas empareja secuencias similares utilizando la medida de la homología asignada a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que se puede usar con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencias o la identidad de secuencias entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína natural y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1.

Un algoritmo típico usado que compara la secuencia de una molécula con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST (Altschul, 1990; Gish, 1993; Madden, 1996; Altschul, 1997; Zhang, 1997), especialmente blastp o tblastn (Altschul, 1997). Los parámetros típicos de BLASTp son: Valor esperado: 10 (por defecto); Filtro: seg (por defecto); Coste de apertura de hueco: 11 (por defecto); Coste de extensión de hueco: 1 (por defecto); alineaciones máximas: 100 (por defecto); Tamaño de palabra: 11 (por defecto); n.º de descripciones: 100 (por defecto); Matriz de penalización: BLOWSUM62.

Cuando se busca una base de datos que contiene secuencias de un gran número de diferentes organismos, es típico comparar secuencias de aminoácidos. Se puede medir la búsqueda en la base de datos usando secuencias de aminoácidos mediante algoritmos diferentes del blastp conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden comparar las secuencias de polipéptidos usando FASTA, un programa de GCG Versión 6.1. FASTA proporciona alineaciones y un porcentaje de identidad de la secuencia de las regiones entre las secuencias de búsqueda y respuesta (Pearson, 1990). Por ejemplo, se puede determinar el porcentaje de identidad de la secuencia entre las secuencias de aminoácidos usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 2 y la matriz de puntuación PAM250), como se proporciona en GCG Versión 6.1.

En determinadas realizaciones, una ruta metabólica convierte una fuente de carbono en un intermedio o producto final deseado. Por ejemplo, una fuente de carbono se puede convertir en piruvato, que se puede metabolizar a acetyl-CoA a PHB o isopreno. Las fuentes de carbono adecuadas pueden ser azúcares. Por ejemplo, una fuente de carbono puede ser un azúcar derivado de la biomasa. Un "azúcar derivado de la biomasa" incluye, aunque no de forma limitativa, moléculas tales como glucosa, sacarosa, manosa, xilosa, y arabinosa. La expresión azúcar derivado de biomasa abarca sustratos de carbono adecuados de 1 a 7 carbonos usados ordinariamente por microorganismos,

tales como azúcares de 3-7 carbonos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, glucosa, lactosa, sorbosa, fructosa, idosa, galactosa y manosa todos tanto en forma D como en forma L, o una combinación de 3-7 azúcares de carbono, tales como glucosa y fructosa, y/o 6 azúcares de carbono ácidos que incluyen, aunque no de forma limitativa, ácido 2-ceto-L-gulónico, ácido idónico (IA), ácido glucónico (GA), 6-fosfogluconato, ácido 2-ceto-D-glucónico (2 KDG), ácido 5-ceto-D-glucónico, 2-cetogluconatofosfato, ácido 2,5-diceto-L-gulónico, ácido 2,3-L-dicetogulónico, ácido deshidroascórbico, ácido eritóbico (EA) y ácido D-manónico.

Las materias primas y residuos celulósicos y lignocelulósicos, tales como residuos agrícolas, madera, residuos forestales, fangos procedentes de la fabricación del papel, y residuos sólidos municipales e industriales, proporcionan una materia prima renovable potencialmente grande para la producción de sustancias químicas, plásticos, combustibles y piensos. Las materias primas y residuos celulósicos y lignocelulósicos, compuestos por polímeros de carbohidratos que comprenden celulosa, hemicelulosa, y lignina puede tratarse generalmente mediante una variedad de medios químicos, mecánicos y enzimáticos para liberar los azúcares de hexosa y pentosa principalmente. Estos azúcares pueden a continuación "alimentarse" en una ruta para producir piruvato como se describe adicionalmente en el presente documento.

La divulgación proporciona los números de registro de diversos genes, homólogos y variantes útiles en la generación de los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento. Debe entenderse que los homólogos y las variantes descritos en el presente documento son ilustrativos y no limitantes. Los homólogos adicionales, variantes y secuencias están disponibles para los expertos en la técnica que utilizan diversas bases de datos que incluyen, por ejemplo, el National Center for Biotechnology Information (NCBI) cuyo acceso está disponible en la World-Wide-Web.

Son conocidas en la técnica las condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento y el mantenimiento de un microorganismo recombinante proporcionado en el presente documento.

Se entiende que puede diseñarse mediante ingeniería genética una gama de microorganismos para expresar una o más enzimas de la divulgación. Se entiende que los diversos organismos pueden actuar como "fuentes" para el material genético que codifica las enzimas diana adecuadas para su uso en un microorganismo recombinante proporcionado en el presente documento.

El término "microorganismo" incluye especies microbianas procariotas y eucariotas procedentes de los Dominios Archaea, Bacteria y Eucarya, incluyendo el último levaduras y hongos filamentosos, protozoos, algas, o Protistas superiores. Los términos "células microbianas" y "microbios" se usan de manera indistinta con el término microorganismo.

El término "procariotas" es reconocido en la técnica y se refiere a células que no contienen núcleo u otros orgánulos celulares. Los procariotas se clasifican generalmente en uno de dos dominios, las Bacteria y las Archaea. La diferencia definitiva entre organismos de los dominios Archaea y Bacteria se basan en diferencias fundamentales en la secuencia de la base nucleotídica en el ARN ribosómico de 16S.

El término "Archaea" se refiere a una clasificación de organismos de la división Mendosicutes, que se encuentran normalmente en entornos inusuales y se distinguen del resto de los procariotas por varios criterios, incluyendo el número de proteínas ribosómicas y la ausencia de ácido murámico en las paredes celulares. En función del análisis del *ssr*ARN, las Archaea consisten en dos grupos filogenéticamente distintos: Crenarchaeota y Euryarchaeota. En función de su fisiología, las Archaea pueden organizarse en tres tipos: metanógenas (procariotas que producen metano); halófilas extremas (procariotas que viven a concentraciones muy altas de sal ([NaCl]); e (hiper) termófilas extremas (procariotas que viven a temperaturas muy altas). A pesar de las características unificantes de las archaeas que las distinguen de las Bacterias (es decir, sin mureína en la pared celular, lípidos de membrana unidos a ésteres, etc.), estos procariotas presentan atributos estructurales o bioquímicos únicos que las adaptan a sus hábitats concretos. Las Crenarchaeota consisten principalmente en procariotas hipertermófilas dependientes de azufre y las Euryarchaeota contienen las metanógenas y halófilas extremas.

"Bacteria", o "eubacteria", se refiere a un dominio de organismos procariotas. Las bacterias incluyen al menos 11 grupos distintos del siguiente modo: (1) bacterias Gram-positivas (gram⁺), de las cuales existen dos subdivisiones principales: (1) grupo con un alto contenido de G+C (Actinomycetes, Mycobacteria, Micrococcus, diferentes) (2) grupo con un bajo contenido de G+C (Bacillus, Clostridia, Lactobacillus, Staphylococci, Streptococci, Mycoplasmas); (2) Proteobacteria, por ejemplo, Bacterias Gram-negativas púrpura fotosintéticas + no fotosintéticas (incluye la mayoría de bacterias Gram-negativas "comunes"); (3) Cyanobacteria, por ejemplo, fotótrofas oxigénicas; (4) Espiroquetas y especies relacionadas; (5) Planctomyces; (6) Bacteroides, Flavobacteria; (7) Chlamydia; (8) Bacterias sulfuradas verdes; (9) Bacterias no sulfuradas verdes (también, fotótrofas anaerobias); (10) *Micrococci radiorresistentes* y relacionados; y (11) Thermotoga y *Thermosipho thermophiles*.

Las "bacterias Gram negativas" incluyen cocos, bacilos no entéricos y bacilos entéricos. Los géneros de bacterias Gram negativas incluyen, por ejemplo, Neisseria, Spirillum, Pasteurella, Brucella, Yersinia, Francisella, Haemophilus, Bordetella, Escherichia, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Proteus, Vibrio, Pseudomonas, Bacteroides, Acetobacter,

Aerobacter, Agrobacterium, Azotobacter, Spirilla, Serratia, Vibrio, Rhizobium, Chlamydia, Rickettsia, Treponema, y Fusobacterium.

5 Las "bacterias Gram positivas" incluyen cocos, bacilos no esporulantes, y bacilos esporulantes. Los géneros de bacterias Gram positivas incluyen, por ejemplo, Actinomyces, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Erysipelothrix, Lactobacillus, Listeria, Mycobacterium, Myxococcus, Nocardia, Staphylococcus, Streptococcus, y Streptomyces.

10 Por consiguiente, la divulgación proporciona una ruta diseñada mediante ingeniería genética *in vitro* o *in vivo* que comprende una NADPH-deshidrogenasa (por ejemplo, una NADPH-PDH o un homólogo de la misma), una NADH-deshidrogenasa (por ejemplo, una NADPH-PDH o un homólogo de la misma), y una NADH-oxidasa (por ejemplo, una NOX o un homólogo de la misma).

15 Como se ha tratado anteriormente, textos generales que describen técnicas de biología molecular útiles en el presente documento, incluyendo el uso de vectores, promotores y muchos otros temas relevantes, incluyen a Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology Volumen 152, (Academic Press, Inc., San Diego, Calif.) ("Berger"); Sambrook et al., Molecular Cloning--A Laboratory Manual, 2ª ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 ("Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado hasta 1999) ("Ausubel").

20 Ejemplos de protocolos suficientes para dirigir a personas expertas a través de procedimientos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación de la Q β -replicasa y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), por ejemplo, para la producción de los ácidos nucleicos homólogos de la divulgación se encuentran en Berger, Sambrook y Ausubel, así como en Mullis et al. (1987) patente de Estados Unidos n.º 4.683.202; Innis et al., eds. 25 1990 PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press Inc. San Diego, Calif.) ("Innis"); Arnheim y Levinson (1 de octubre de 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli et al. (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 1874; Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem 35: 1826; Landegren et al. (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 30 291-294; Wu y Wallace (1989) Gene 4:560; Barringer et al. (1990) Gene 89:117; y Sooknanan y Malek (1995) Biotechnology 13: 563-564.

35 Los procedimientos mejorados para la clonación de ácidos nucleicos amplificados *in vitro* se describen en Wallace et al., patente de EE.UU n.º 5.426.039.

40 Los procedimientos mejorados para amplificar ácidos nucleicos grandes mediante PCR se resumen en Cheng et al. (1994) Nature 369: 684-685 y en las referencias citadas en el mismo, donde se generan amplicones de PCR de hasta 40 kb. Un experto apreciará que esencialmente cualquier ARN puede convertirse en un ADN de bicatenario adecuado para la digestión de restricción, expansión de PCR y secuenciación utilizando transcriptasa inversa y una polimerasa. Véase, por ejemplo, Ausubel, Sambrook y Berger, todos citados anteriormente.

La invención se ilustra en los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes.

45 Ejemplos

Materiales. Se usó medio LB de Miller o agar-LB de Miller (BD Difco) para el crecimiento de las cepas bacterianas en medio líquido o sólido. *E. coli* BL21Gold(DE3) [B, F-, *ompT*, *hsdS_B*, (*r_B*-,*m_B*-), *dcm*+, *Tetr*, *gal*], (DE3) *endA Hte* (Agilent) se usó como hospedador tanto para la clonación como para la expresión de las proteínas recombinantes usando vectores pET. *E. coli* TOP10(DE3) [F-*mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 50 *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1* λ] se usó para la expresión de proteínas recombinantes a partir del vector pBAD/p15A. Los plásmidos pET28a(+) y pET22b(+) se adquirieron de Novagen. Se usó HotStart Taq Mastermix (Denville) para la amplificación génica del ADN genómico o plásmido. ADN polimerasa *Phusion* (Finnzymes), DNA ligasa Taq (MCLab), y Exonucleasa T5 (Epicenter) se adquirieron por separado y se usaron para preparar la mezcla maestra de ensamblaje (AMM) usada para la clonación. ATP, ácido (\pm)- α -lipoico, piruvato, 55 Coenzima A, y NAD⁺ fueron de Sigma.

Construcción del plásmido. Se construyeron los plásmidos de expresión para las enzimas PHB a partir de la estructura principal del plásmido pET28a usando los sitios de corte Nde1 y Sac1 para producir construcciones con 60 6X etiquetas tag en el extremo N para la purificación. Los genes que codifican la acetil CoA acetiltransferasa (*phaA*; YP_725941) y la acetoacetil-CoA reductasa (*phaB*; YP_725942) se amplificaron y clonaron a partir del ADN genómico de *R. eutropha*. El gen que codifica la polihidroxibutirato sintasa (*phaC*; HE_610111) se sintetizó y optimizó por codones para su expresión en un hospedador de *E. coli* antes de subclonarse en el vector de expresión pET28a. Para la ruta del isopreno, las construcciones fueron las mismas que las descritas en la referencia (Korman, 65 T. P., Sahachartsiri, B., Li, D., Vinokur, J. M., Eisenberg, D. y Bowie, J. U. (2014), "A synthetic biochemistry system for the *in vitro* production of isoprene from glycolysis intermediates". Protein Science. doi: 10.1002/pro.2436).

Se usaron células *E. coli* BL21-Gold como la cepa hospedadora para la expresión de las enzimas. Todas las enzimas se expresaron en medio de Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y se indujeron con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido 0,2 mM añadido al cultivo al final del crecimiento en fase logarítmica. Las phaA, phaB, MVK, PMVK, e IspS se indujeron a 37 °C durante la noche y phaB, THL/HMGR, HMGS, e IDI se indujeron a 18 °C durante la noche. La phaC se indujo a 25 °C durante 5 horas antes de la recogida.

Purificación de la enzima. Las células de 0,5 l de cultivo se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en Tris 150 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM. Se lisaron las células en hielo con sonicación y se retiraron los residuos celulares mediante centrifugación a 12.000 x g a 4 °C. El sobrenadante se mezcló a continuación con 5 ml de níquel-ácido nitrilotriacético (NTA) agarosa, y después de 30 minutos, la suspensión de agarosa se cargó sobre una columna de gravedad y se lavó con cinco volúmenes de columna de Tris 100 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, imidazol 15 mM. A continuación se eluyó la enzima con imidazol 250 mM, Tris 100 mM, pH 7,5. La enzima resultante se dializó en Tris 50 mM pH 7,5 NaCl 50 mM y se almacenó a 4 °C.

Vectores de expresión para las subunidades E1αβ, E2, y E3, de PDH, y LpIA de *E. coli*. Los dominios E1, E2, y E3 se amplificaron por separado a partir del ADN genómico de *G. stearothermophilus* (ATCC) usando cebadores que contenían 15-20 pb complementarias del gen y 15-20 pb complementarias del sitio de clonación múltiple en el vector donde se colocaría el gen. Los genes que codifican E1α y E1β se amplificaron juntos a partir del ADN genómico de *G. stearothermophilus* y se clonaron en pET28a(+) que se había digerido con NcoI y XhoI. Esto creó una construcción sin etiqueta para la expresión de E1 bajo el control del promotor T7 donde la traducción de E1α utiliza el RBS procedente del vector pET28 mientras que E1β utiliza el RBS endógeno de *G. stearothermophilus*. Los dominios E2 y E3 se amplificaron por separado y se clonaron en pET22b(+) digerido con NdeI y XhoI o pET28a(+) digerido con NcoI y XhoI respectivamente para crear las construcciones E2 y E3 sin etiqueta. La lipoato proteína ligasa de *E. coli*, LpIA, se amplificó a partir del ADN genómico de *E. coli* K12 y se ensambló en pBAD/p15A digerido con XhoI y EcoRI para crear 6xHis-LpIA.

Expresión en exceso y purificación de las subunidades PDH de *G. stearothermophilus* y LpIA de *E. coli*. Todas las cepas de *E. coli* se hicieron crecer a 37 °C en medio LB suplementado con un antibiótico adecuado (100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de kanamicina, o 34 µg/ml de cloranfenicol). Para todas las construcciones, se usaron 5 ml del cultivo iniciador nocturno para inocular 1 l de medio LB. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,6, se añadieron IPTG 0,3 mM (vectores pET) o arabinosa al 0,02 % (pBAD/p15A) para inducir la expresión de la proteína. Después de 16 horas, se recogieron las células, se resuspendieron (4 ml/g de células húmedas) en Tris-Cl 50 mM pH 7,5 NaCl 0,1 M (Tampón A), se lisaron mediante sonicación, y se retiraron los residuos celulares mediante centrifugación a 30.000xg durante 20 min.

25 ml del lisado de *E. coli* que contenía 6xHis-LpIA se cargaron en 3 ml de una resina Ni-NTA (Qiagen), se lavaron con 25 ml de Tampón A que contenía imidazol 10 mM, y se eluyeron con 5 ml de Tampón A que contenía imidazol 250 mM. A continuación se almacenó 6xHis-LpIA puro a 4 °C hasta su uso.

Los dominios individuales de PDH de *G. stearothermophilus* se purificaron parcialmente a partir de lisados de *E. coli* con calor antes de la modificación y la reconstitución del complejo PDH. Los lisados que contenían E1αβ, E2, o E3 se incubaron a 65 °C durante 35 minutos para desnaturalizar térmicamente las proteínas de *E. coli* seguido por centrifugación a 30.000xg durante 20 min para aglomerar las proteínas precipitadas. Casi todos los dominios PDH permanecen en el sobrenadante. A continuación, el dominio E2 se lipó en el extracto calentado mediante la adición de ácido (±)-α-lipoico 1 mM, ATP 2 mM, MgCl₂ 3 mM y 50 µg de 6xHis-LpIA purificado. A continuación se dejó continuar la reacción de lipoación con una mezcla suave durante la noche a 25 °C, proporcionando E2 lipoado (E2lip). Tras la lipoación, E1αβ, E2lip, y E3 se mezclaron en una relación molar 3:1:3 y se incubaron durante al menos 1 hora a 25 °C para formar el complejo GsPDH activo. A continuación se aisló el complejo GsPDH mediante ultracentrifugación (Beckman) durante 4 horas a 95.000xg. El aglomerado amarillo resultante se resuspendió en Tris-Cl 20 mM, pH 7,5 en 1/50 del volumen de partida y se evaluó su actividad. El análisis de SDS-PAGE confirmó la presencia de los 4 dominios e indicó que la preparación era >90 % pura. El complejo reconstituido se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Actividad y optimización enzimática. Se evaluó NoxE controlando la oxidación del NAD(P)H a 340 nm. Se llevó a cabo el ensayo en Tris-HCl 100 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM, KCl 5 mM, y NAD(P)H 0,2 mM.

Se evaluaron PDH WT y mutante controlando la reducción de NAD(P)⁺ a 340 nm. Se llevó a cabo el ensayo en Tris 50 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM, piruvato 5 mM, CoA 1 mM, y 0,5 mM de NAD(P)⁺.

Se evaluó PhaC controlando la absorbancia de la hidrólisis del enlace tioéster del sustrato 3HBCoA a 235 nm. Se llevó a cabo el ensayo en Tris 100 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM y 3HBCoA 0,15 mM.

Se midieron las actividades de la ruta del isopreno como se ha notificado anteriormente (Korman et al.). En la Tabla A se muestra la cantidad de cada enzima en la ruta reconstituida del isopreno descrita a continuación.

Tabla A. Lista de las enzimas y actividades utilizadas en la producción de PHB o isopreno a partir de piruvato.

	Enzima	Unidades/mg	mg añadidos	Unidades añadidas
1	GsPDH ^{NAD}	0,082±0,007	0,002/0,0013	0,00016/0,00011
1'	GsPDH ^{NADP}	0,12 ± 0,008	0,076/0,0095	0,009/0,001
2	NoxE	0,35 ±0,036	0,020/0,00625	0,007/0,0022
3	PhaA	76,2 ± 4,4	0,023	1,75
4	PhaB	6,1 ± 0,6	0,014	0,085
5	PhaC	142,7	0,032	4,57
6	<i>Ef</i> THL-HMGR	0,06 ± 0,002 ^a	0,003	0,00018
7	<i>Ef</i> HMGS ^b	0,6 ±0,01	0,041	0,025
8	<i>Ef</i> HMGR	0,06 ± 0,002 ^a	0,023	0,0014
9	ScMVK	47,0 ± 0,9	0,008	0,38
10	SsPMVK	0,8 ±0,02	0,029	0,023
11	ScMDC	4,0 ± 0,07	0,038	0,152
12	<i>Ec</i> DI	0,035 ^c	0,083	0,003
13	<i>Palsp</i> S	0,156 ^d	0,088	0,014

a) Evaluado en dirección directa (síntesis) mediante acoplamiento con MvaS y controlando el consumo de NADPH

- 5 **Condiciones de reacción y análisis final de PHB.** La reacción autosostenida optimizada para la biotransformación del piruvato a PHB estaba compuesta por Tris 250 mM pH 7,5, MgCl 5 mM, KCl 5 mM, CoA 0,5 mM, NAD⁺0,1 mM, NADP⁺0,5 mM, piruvato 50 mM, 2 µg de PDH^{NADH}, 76 µg de PDH^{NADPH}, 23 µg de phaA, 14 µg de phaB, y 32 µg de phaC en un volumen de reacción final de 200 µl. Se iniciaron las reacciones con la adición de piruvato, que se dejó fuera de la mezcla inicial. Se llevaron a cabo todas las reacciones de PHB a temperatura ambiente. Para el ensayo del comportamiento autorregulador de la válvula de purga, algunas concentraciones enzimáticas fueron subóptimas: 5 µg de phaA, 2,5 µg phaB, y 1,9 µg de phaC.

15 Para ensayar las PHB, las reacciones se liofilizaron y se incubaron con 1 ml de cloroformo, 0,45 ml de metanol, y 0,05 ml de H₂SO₄ para hidrolizar el polímero y generar metil 3-hidroxitirato. Se extrajeron las reacciones con 0,5 ml de agua y se aplicó 1 µl de la capa de cloroformo a una columna HP-Innowax de 0,25 micrómetros usando un cromatógrafo de gases HP 5890 de la Serie II. El método GC usó una temperatura de inyección que se mantuvo a 35 °C durante 5 minutos antes de que se aumentara a 275 °C durante 40 minutos. Se compararon las intensidades máximas con un patrón auténtico para evaluar las concentraciones.

20 **Condiciones de reacción y análisis del isopreno.** Se llevó a cabo la producción *in vitro* de isopreno como se ha descrito anteriormente (Korman et al.) con los siguientes cambios. Se configuraron reacciones de 200 µl en viales de gas de 2 ml precintados que contenían enzimas, piruvato 3 mM, ATP 15 mM, CoA 0,6 mM, NAD⁺0,2 mM, NADP⁺0,4 mM (o NADPH 5 mM), MgCl₂ 10 mM, KCl 20 mM, pirofosfato de tiamina 0,1 mM en tris-Cl 100 mM pH 8,5 y se incubaron a 32 °C durante 18 horas. Se controló la producción de isopreno mediante muestreo directo de 100 µl del espacio superior usando una jeringa hermética 100 µl. Se analizó el espacio superior mediante GC-FID (HP5980II) equipado con una columna GS-GasPro (0,32 mm x 30 m, Agilent). Se cuantificó la cantidad de isopreno producida mediante comparación con una curva patrón de varias concentraciones de isopreno muestreadas de la misma manera.

30 Para implementar el módulo de la válvula de purga, fue necesario una PDH que utilizaba un NADP⁺. Se ha diseñado mediante ingeniería genética un PDH mutante de *E. coli* para que tuviera especificidad por NADP⁺ introduciendo mutaciones en la enzima E3 (EcE3). El PDH de *E. coli* era, sin embargo, inestable. Se diseñó mediante ingeniería genética una PDH mutante de *G. stearothermophilus* termófilo que acepta preferentemente NADP⁺ con estabilidad enzimática aumentada.

35 De manera similar al diseño de la PDH mutante de *E. coli*, se diseñó la PDH mutante de *G. stearothermophilus* (SEQ ID NO:7) superponiendo la estructura conocida de la subunidad E3 del *G. stearothermophilus* (GsE3) con la estructura conocida de la glutatión reductasa de *E. coli* relacionada, que utiliza NADP⁺. La superposición estructural permitió el posicionamiento del resto fosfato adicional en el sitio activo del GsE3, basándose en cómo se había colocado en la glutatión reductasa (véase la Fig. 2). Las sustituciones de la cadena lateral fueron entonces las diseñadas para GsE3 que podían permitir la aceptación del fosfato. Se identificó la directriz de un diseño satisfactorio anterior de la enzima EcE3 que comparte un 47 % de identidad de la secuencia con la GsE3. Las mutaciones introducidas en EcE3 fueron E206V, G207R, A208K, G209H y S213R (numeración de GsE3). Tras examinar los cambios en el contexto de la estructura de GsE3, se introdujeron todos, salvo G209H, ya que parecía que la nueva cadena lateral His podría producir choques estéricos con los restos K224 y N237 cercanos.

Las propiedades cinéticas de las enzimas diseñadas mediante ingeniería genética y las enzimas naturales desvelan que las mutaciones alteran la especificidad como se deseaba.

5 Los parámetros cinéticos se relacionan en la Tabla B. Para la enzima (GsPDH^{NADH}) de *G. stearothermophilus* natural, k_{cat} es 11,2 veces mayor con NAD⁺ que NADP⁺ y k_{cat}/K_m es 1150 veces mayor. Para el mutante (GsPDh^{NADPH}) diseñado mediante ingeniería genética, k_{cat} es 7,3 veces mayor con NADP⁺ que NAD⁺ y k_{cat}/K_m es 21 veces mayor. Así, los inventores fueron capaces de dar la vuelta a la especificidad de la enzima PDH.

Tabla B. Lista de las propiedades catalíticas de las enzimas de la válvula de purga.

Nombre de la enzima	Sustrato	K_m (mM)	k_{cat} (μ M/min/mg)	k_{cat}/K_m
GsPDH - NAD ⁺	NAD ⁺	0,013381 \pm 0,00083	82,651 \pm 0,66	6167,91
	NADP ⁺	1,381 \pm 0,41	7,3954 \pm 0,85	5,36
	Piruvato	0,52736 \pm 0,049	91,976 \pm 1,9	174,40
GsPDH - NADP	NADP ⁺	0,157 \pm 0,013	117,75 \pm 8,1	750,00
	NAD ⁺	0,45269 \pm 0,178	16,104 \pm 1,8	35,56
	Piruvato	0,42328 \pm 0,068	174,3 \pm 2,7	411,76
NoxE	NADH	0,074925 \pm 0,026	348,57 \pm 36,5	4653,81
	NADPH	2,9515 \pm 0,77	1,4009 \pm 0,32	0,47

10 Las enzimas GsPDH^{NADH} y GsPDH^{nadph} (designadas de ahora en adelante PDH^{nadh} y PDH^{NADPH}) fueron mucho más estables que sus homólogas de *E. coli*. Como se muestra en la Figura 7, las enzimas de *G. stearothermophilus* retuvieron ~50 % de actividad tras una hora de incubación a 67 °C mientras que las enzimas PDH de *E. coli* se inactivaron completamente a 50 °C.

15 Un segundo aspecto del diseño de la válvula de purga es el uso de una NADH oxidasa con una especificidad alta por el cofactor. Se seleccionó NoxE de *L. lactis* ya que esta es una NADH oxidasa formadora de agua por lo que no genera ningún producto tóxico tal como peróxido de hidrógeno. Tal como se muestra en la Tabla B, la K_{cat} de NoxE es 248,8 veces mayor con NADH que NADPH y la k_{cat}/K_m es 9900 veces mayor.

20 En la Tabla C se relacionan las enzimas seleccionadas para los diversos experimentos. En las etapas iniciales solo se usaron el complejo PDH^{nadh} natural y NoxE para generar Acetil-CoA y NADPH se suministró exógenamente. Tras optimizar las relaciones enzimáticas en este sistema, se añadió la PDH^{NADPH} mutante para ensayar la generación de NADPH *in situ*. Por último, se optimizó la cantidad de PDH^{NADPH}, manteniendo las otras enzimas fijas.

Enzima	Nombre	Número de registro	Plásmido	Etiqueta	Organismo	
Válvula de purga						
1	PDH ^{NADH}	Complejo de la piruvato deshidrogenasa			<i>G. stearothermophilus</i>	
1'	PDH ^{nadph}				<i>G. stearothermophilus</i>	
1a	E1a	Subunidad a de la piruvato deshidrogenasa	P21873 (SEQ ID NO:1)	pET28	ninguna	<i>G. stearothermophilus</i>
1b	E1b	Subunidad b de la piruvato deshidrogenasa	P21874 (SEQ ID NO:2)	pET28	ninguna	<i>G. stearothermophilus</i>
1c	E2	Dihidrolipoamida Acetiltransferasa	CAA37630 (SEQ ID NO:3)	pET22	ninguna	<i>G. stearothermophilus</i>
1d	E3 ^{NADH}	Dihidrolipoamida Deshidrogenasa	P11959 (SEQ ID NO:5)	pET28	ninguna	<i>G. stearothermophilus</i>
1'd	E3 ^{NADPH}	Dihidrolipoamida deshidrogenasa mutante	P11959 (SEQ ID NO:7)	pET29	ninguna	<i>G. stearothermophilus</i>
1e	LpIA	Lipoato Proteína Ligasa	NP_418803 (SEQ ID NO:8)	pBAD/p15A	N-His	<i>E. coli</i>
2	NoxE	NADH oxidasa (formadora de H ₂ O)	YP 007507681 (SEQ ID NO:10)	pET22	C-His	<i>L. lactis</i>
Ruta de PHB						
3	PhaA	Acetil-CoA acetiltransferasa	GJUU-1435 (SEQ ID NO: 11)	pET28	N-His	<i>R. eutropha</i>
4	PhaB	3-hidroxibutiril-CoA reductasa	GJUU-1436 (SEQ ID NO:12)	pET28	N-His	<i>R. eutropha</i>
5	PhaC	Polihidroxibutirato sintasa	G8BLJ2 (SEQ ID NO: 13)	pET28	N-His	<i>C. necator</i> sp. S-6

(continuación)

Enzima	Nombre	Número de registro	Plásmido	Etiqueta	Organismo	
Ruta del isopreno						
6	THL/HMGR	Fusión de Tiolasa/HMG-CoA Reductasa	WP 002357755 (SEQ ID NO:14)	pET28	N-His	<i>E. faecalis</i>
7	HMGS	HMG-CoA Sintasa A110G Mutante	WP 010785222 (SEQ ID NO:15)	pET28	N-His	<i>E. faecalis</i>
8	HMGR	HMG-CoA Reductasa	WP 002357755 (SEQ ID NO:16)	pET28	N-His	<i>E. faecalis</i>
9	MVK	mevalonato quinasa	BAA24409 (SEQ ID NO: 17)	pET28	N-His	<i>S. cerevisiae</i>
10	PMVK	fosfomevalonato quinasa	NP_344303 (SEQ ID NO:18)	pET28	N-His	<i>S. solfataricus</i>
11	MDC	difosfomevalonato decarboxilasa	NP_014441 (SEQ ID NO: 19)	pET28	N-His	<i>S. cerevisiae</i>
12	Idi	isopentenil difosfato isomerasa	NP_417365 (SEQ ID NO:20)	pET22	C-His	<i>E. coli</i>
13	IspS	Isopreno Sintasa	Q50L36 (SEQ ID NO:21)	pET28	N-His	<i>P. alba</i>

Las SEQ ID NOS que se muestran anteriormente proporcionan las secuencias polipeptídicas. Las secuencias de codificación están fácilmente disponibles para un experto en la materia.

5

En la Fig. 3 se muestra el progreso del piruvato optimizado a la reacción de PHB junto con un control de la ausencia de la última enzima, phaC. Ambas reacciones tenían una relación $PDH^{NADPH}:PDH^{NADH}$ de 40:1. En esta relación, los niveles de NADPH aumentan rápidamente (A_{340}) y se mantienen a lo largo del transcurso de tiempo (NoxE oxida rápidamente a NADH de tal manera que los cambios en A_{340} reflejan solo cambios en los niveles de NADPH). Al mismo tiempo, se producen los gránulos de PHB como se controla mediante A_{600} ³⁶.

10

Se evaluó la producción de PHB usando un método de cromatografía de gases y se encontró que la reacción optimizada producía $2,45 \pm 0,5$ mg/ml de PHB a partir de piruvato 50 mM que representa la conversión casi completa (94 ± 20 %) del piruvato a plástico. En el sistema optimizado, se usaron inicialmente 0,5 mM de $NADP^+$, conseguir de esta manera un rendimiento del 94 % requiere aproximadamente 90 renovaciones del cofactor $NADP^+$, indicando un alto nivel de sostenibilidad del sistema.

15

Se evaluó la estabilidad del sistema completo mezclando los componentes e iniciando a continuación la reacción con diversas demoras de tiempo. En la Fig. 8 se muestra la disminución en la extensión de la reacción. La extensión de la reacción sigue siendo de ~50 % después de dos días.

20

El comportamiento regulador de la válvula de purga es mejor observarlo a concentraciones subóptimas de la enzima y relaciones de y relaciones de PDH^{NADPH} a PDH^{NADH} que ralentizan el tiempo de respuesta. En el ensayo optimizado (relación molar 40:1 de $PDH^{NADPH}:PDH^{NADH}$), se observó un rápido aumento en los niveles de NADPH, que se mantuvo en todo momento. En los sistemas no óptimos que se muestran en la Fig. 4, la válvula de purga no puede responder tan rápidamente a la bajada de las concentraciones de NADPH de tal manera que se observaron variaciones en los niveles de NADPH a medida que se desarrolla el sistema. Los inventores observaron también un rápido aumento inicial en los niveles de NADPH, pero a medida que se acumulan los intermedios, el consumo comienza a superar la producción de NADPH. En última instancia, el sistema se compensa generando mayores niveles de NADPH.

25

30

Para ensayar si el sistema era robusto a los cambios en los niveles de cofactores, se variaron las concentraciones de cofactores iniciales en las reacciones y se midieron los rendimientos de PHB. Se construyó cada reacción con las combinaciones de NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$ o $NADPH$ a cualquiera de 0,1 mM o 1 mM y se controló la producción de PHB mediante la DO final a 600 nm. Se compararon todas las condiciones de reacción con la reacción optimizada que produjo la conversión casi completa del piruvato en PHB y estuvieron comprendidas en una variación aleatoria. Este resultado indica que la válvula de purga puede compensar fácilmente los cambios en las concentraciones de cofactores y los estados de reducción.

35

Para ensayar la versatilidad de la válvula de purga molecular y si se puede aplicar como plataforma general para la producción de una gama diversa de compuestos derivados de Acetil-CoA, se usó la válvula de purga de PDH para producir isopreno mediante la ruta del mevalonato dependiente de Acetil-CoA. Korman et al. describieron anteriormente la producción *in vitro* de isopreno a partir de piruvato, que requirió el uso de NADPH añadido exógenamente. De manera similar a la ruta de PHB, la ruta del mevalonato tiene una estequiometría del carbono y de cofactores inherentemente diferente. En particular, la ruta del mevalonato requiere 3 Acetil-CoA y 2 NADPH para

40

45

la producción de isopreno (véase la Fig. 6A). Así, la sostenibilidad del sistema requiere la generación y regulación de los niveles de NADPH.

5 Se llevaron a cabo experimentos para ensayar si el sistema de la válvula de purga puede sustituir el NADPH añadido exógenamente en la producción de isopreno. Como se muestra en la Fig. 6B, el sistema completo de la válvula de purga produce un rendimiento del $88,2 \pm 8,4$ % a partir de piruvato 3 mM. Este rendimiento es incluso mayor que el rendimiento de $81,4 \pm 2,0$ % obtenido cuando los inventores añadieron NADPH exógenamente (Fig. 6B). Si cualquiera de los componentes de la válvula de purga (PDH^{NADPH} , PDH^{NADH} o NoxE) se abandona, los rendimientos se redujeron drásticamente. Así, el sistema de la válvula de purga es transportable a otros sistemas bioquímicos sintéticos.
10

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Los rectores de la Universidad de California
- <120> UN MÓDULO DE VÁLVULA DE PURGA MOLECULAR BIOQUÍMICO SINTÉTICO QUE MANTIENE EL EQUILIBRIO DE COFACTORES
- 20 <130> 00011-077WO1
- <140> Sin asignar todavía
- <141> 02-04-2015
- 25 <150> US 61/974.311
- <151> 02-04-2014
- <160> 21
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 369
- <212> PRT
- 35 <213> Geobacillus stearothermophilus
- <400> 1

ES 2 786 226 T3

Met Gly Val Lys Thr Phe Gln Phe Pro Phe Ala Glu Gln Leu Glu Lys
1 5 10 15
Val Ala Glu Gln Phe Pro Thr Phe Gln Ile Leu Asn Glu Glu Gly Glu
20 25 30
Val Val Asn Glu Glu Ala Met Pro Glu Leu Ser Asp Glu Gln Leu Lys
35 40 45
Glu Leu Met Arg Arg Met Val Tyr Thr Arg Ile Leu Asp Gln Arg Ser
50 55 60
Ile Ser Leu Asn Arg Gln Gly Arg Leu Gly Phe Tyr Ala Pro Thr Ala
65 70 75 80
Gly Gln Glu Ala Ser Gln Ile Ala Ser His Phe Ala Leu Glu Lys Glu
85 90 95
Asp Phe Ile Leu Pro Gly Tyr Arg Asp Val Pro Gln Ile Ile Trp His
100 105 110
Gly Leu Pro Leu Tyr Gln Ala Phe Leu Phe Ser Arg Gly His Phe His
115 120 125
Gly Asn Gln Ile Pro Glu Gly Val Asn Val Leu Pro Pro Gln Ile Ile
130 135 140
Ile Gly Ala Gln Tyr Ile Gln Ala Ala Gly Val Ala Leu Gly Leu Lys
145 150 155 160
Met Arg Gly Lys Lys Ala Val Ala Ile Thr Tyr Thr Gly Asp Gly Gly
165 170 175
Thr Ser Gln Gly Asp Phe Tyr Glu Gly Ile Asn Phe Ala Gly Ala Phe
180 185 190
Lys Ala Pro Ala Ile Phe Val Val Gln Asn Asn Arg Phe Ala Ile Ser
195 200 205
Thr Pro Val Glu Lys Gln Thr Val Ala Lys Thr Leu Ala Gln Lys Ala
210 215 220
Val Ala Ala Gly Ile Pro Gly Ile Gln Val Asp Gly Met Asp Pro Leu
225 230 235 240
Ala Val Tyr Ala Ala Val Lys Ala Ala Arg Glu Arg Ala Ile Asn Gly
245 250 255
Glu Gly Pro Thr Leu Ile Glu Thr Leu Cys Phe Arg Tyr Gly Pro His
260 265 270
Thr Met Ser Gly Asp Asp Pro Thr Arg Tyr Arg Ser Lys Glu Leu Glu
275 280 285
Asn Glu Trp Ala Lys Lys Asp Pro Leu Val Arg Phe Arg Lys Phe Leu
290 295 300
Glu Ala Lys Gly Leu Trp Ser Glu Glu Glu Glu Asn Asn Val Ile Glu
305 310 315 320
Gln Ala Lys Glu Glu Ile Lys Glu Ala Ile Lys Lys Ala Asp Glu Thr
325 330 335
Pro Lys Gln Lys Val Thr Asp Leu Ile Ser Ile Met Phe Glu Glu Leu
340 345 350
Pro Phe Asn Leu Lys Glu Gln Tyr Glu Ile Tyr Lys Glu Lys Glu Ser
355 360 365
Lys

<210> 2
<211> 325
5 <212> PRT
<213> Geobacillus stearothermophilus

<400> 2

ES 2 786 226 T3

Met Ala Gln Met Thr Met Val Gln Ala Ile Thr Asp Ala Leu Arg Ile
 1 5 10 15
 Glu Leu Lys Asn Asp Pro Asn Val Leu Ile Phe Gly Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Val Asn Gly Gly Val Phe Arg Ala Thr Glu Gly Leu Gln Ala Glu Phe
 35 40 45
 Gly Glu Asp Arg Val Phe Asp Thr Pro Leu Ala Glu Ser Gly Ile Gly
 50 55 60
 Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Leu Gln Gly Phe Arg Pro Val Pro Glu
 65 70 75 80
 Ile Gln Phe Phe Gly Phe Val Tyr Glu Val Met Asp Ser Ile Cys Gly
 85 90 95
 Gln Met Ala Arg Ile Arg Tyr Arg Thr Gly Gly Arg Tyr His Met Pro
 100 105 110
 Ile Thr Ile Arg Ser Pro Phe Gly Gly Gly Val His Thr Pro Glu Leu
 115 120 125
 His Ser Asp Ser Leu Glu Gly Leu Val Ala Gln Gln Pro Gly Leu Lys
 130 135 140
 Val Val Ile Pro Ser Thr Pro Tyr Asp Ala Lys Gly Leu Leu Ile Ser
 145 150 155 160
 Ala Ile Arg Asp Asn Asp Pro Val Ile Phe Leu Glu His Leu Lys Leu
 165 170 175
 Tyr Arg Ser Phe Arg Gln Glu Val Pro Glu Gly Glu Tyr Thr Ile Pro
 180 185 190
 Ile Gly Lys Ala Asp Ile Lys Arg Glu Gly Lys Asp Ile Thr Ile Ile
 195 200 205
 Ala Tyr Gly Ala Met Val His Glu Ser Leu Lys Ala Ala Ala Glu Leu
 210 215 220
 Glu Lys Glu Gly Ile Ser Ala Glu Val Val Asp Leu Arg Thr Val Gln
 225 230 235 240
 Pro Leu Asp Ile Glu Thr Ile Ile Gly Ser Val Glu Lys Thr Gly Arg
 245 250 255
 Ala Ile Val Val Gln Glu Ala Gln Arg Gln Ala Gly Ile Ala Ala Asn
 260 265 270
 Val Val Ala Glu Ile Asn Glu Arg Ala Ile Leu Ser Leu Glu Ala Pro
 275 280 285
 Val Leu Arg Val Ala Ala Pro Asp Thr Val Tyr Pro Phe Ala Gln Ala
 290 295 300
 Glu Ser Val Trp Leu Pro Asn Phe Lys Asp Val Ile Glu Thr Ala Lys
 305 310 315 320
 Lys Val Met Asn Phe

325

<210> 3
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Geobacillus stearothermophilus

5

<400> 3

ES 2 786 226 T3

Met Ala Phe Glu Phe Lys Leu Pro Asp Ile Gly Glu Gly Ile His Glu
1 5 10 15
Gly Glu Ile Val Lys Trp Phe Val Lys Pro Gly Asp Glu Val Asn Glu
20 25 30
Asp Asp Val Leu Cys Glu Val Gln Asn Asp Lys Ala Val Val Glu Ile
35 40 45
Pro Ser Pro Val Lys Gly Lys Val Leu Glu Ile Leu Val Pro Glu Gly
50 55 60
Thr Val Ala Thr Val Gly Gln Thr Leu Ile Thr Leu Asp Ala Pro Gly
65 70 75 80
Tyr Glu Asn Met Thr Phe Lys Gly Gln Glu Gln Glu Glu Ala Lys Lys
85 90 95
Glu Glu Lys Thr Glu Thr Val Ser Lys Glu Glu Lys Val Asp Ala Val
100 105 110
Ala Pro Asn Ala Pro Ala Ala Glu Ala Glu Ala Gly Pro Asn Arg Arg
115 120 125
Val Ile Ala Met Pro Ser Val Arg Lys Tyr Ala Arg Glu Lys Gly Val
130 135 140
Asp Ile Arg Leu Val Gln Gly Thr Gly Lys Asn Gly Arg Val Leu Lys
145 150 155 160
Glu Asp Ile Asp Ala Phe Leu Ala Gly Gly Ala Lys Pro Ala Pro Ala
165 170 175
Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys Pro Ala Thr Thr
180 185 190
Glu Gly Glu Phe Pro Glu Thr Arg Glu Lys Met Ser Gly Ile Arg Arg
195 200 205
Ala Ile Ala Lys Ala Met Val His Ser Lys His Thr Ala Pro His Val
210 215 220
Thr Leu Met Asp Glu Ala Asp Val Thr Lys Leu Val Ala His Arg Lys
225 230 235 240
Lys Phe Lys Ala Ile Ala Ala Glu Lys Gly Ile Lys Leu Thr Phe Leu
245 250 255
Pro Tyr Val Val Lys Ala Leu Val Ser Ala Leu Arg Glu Tyr Pro Val
260 265 270
Leu Asn Thr Ser Ile Asp Asp Glu Thr Glu Glu Ile Ile Gln Lys His
275 280 285
Tyr Tyr Asn Ile Gly Ile Ala Ala Asp Thr Asp Arg Gly Leu Leu Val
290 295 300
Pro Val Ile Lys His Ala Asp Arg Lys Pro Ile Phe Ala Leu Ala Gln
305 310 315 320
Glu Ile Asn Glu Leu Ala Glu Lys Ala Arg Asp Gly Lys Leu Thr Pro
325 330 335
Gly Glu Met Lys Gly Ala Ser Cys Thr Ile Thr Asn Ile Gly Ser Ala
340 345 350
Gly Gly Gln Trp Phe Thr Pro Val Ile Asn His Pro Glu Val Ala Ile
355 360 365
Leu Gly Ile Gly Arg Ile Ala Glu Lys Pro Ile Val Arg Asp Gly Glu
370 375 380
Ile Val Ala Ala Pro Met Leu Ala Leu Ser Leu Ser Phe Asp His Arg
385 390 395 400
Met Ile Asp Gly Ala Thr Ala Gln Lys Ala Leu Asn His Ile Lys Arg
405 410 415
Leu Leu Ser Asp Pro Glu Leu Leu Leu Met Glu Ala
420 425

<210> 4
<211> 1413
<212> ADN
<213> Geobacillus stearothermophilus

5

<220>

ES 2 786 226 T3

<221> CDS
<222> (1)..(1413)

<400> 4

5

atg gta gtt ggc gat ttt gca att gaa acg gaa acg ctt gtc gtc ggc	48
Met Val Val Gly Asp Phe Ala Ile Glu Thr Glu Thr Leu Val Val Gly	
1 5 10 15	
gcc ggt cct ggc ggg tat gtc gcc gcc atc cgc gcc gcg cag ctc gga	96
Ala Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Ala Gln Leu Gly	
20 25 30	
caa aaa gtg acg att gtg gaa aag ggc aat tta ggc ggc gtc tgc tta	144
Gln Lys Val Thr Ile Val Glu Lys Gly Asn Leu Gly Gly Val Cys Leu	
35 40 45	
aat gtt ggc tgc atc ccg tca aag gcg ctg atc tcc gca agc cat cgc	192
Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Ile Ser Ala Ser His Arg	
50 55 60	
tat gag cag gcg aag cat tcc gaa gaa atg ggc att aag gcg gag aac	240
Tyr Glu Gln Ala Lys His Ser Glu Glu Met Gly Ile Lys Ala Glu Asn	
65 70 75 80	
gtc acc atc gat ttt gcc aaa gtg caa gaa tgg aaa gca agc gtc gtg	288
Val Thr Ile Asp Phe Ala Lys Val Gln Glu Trp Lys Ala Ser Val Val	
85 90 95	
aaa aaa tta acg ggc ggc gtc gaa ggg ctg tta aaa gga aac aaa gta	336
Lys Lys Leu Thr Gly Gly Val Glu Gly Leu Leu Lys Gly Asn Lys Val	
100 105 110	
gag atc gtc aaa ggg gaa gcg tat ttt gtc gac gcc aat acg gtg cgt	384
Glu Ile Val Lys Gly Glu Ala Tyr Phe Val Asp Ala Asn Thr Val Arg	
115 120 125	
gtc gtc aac ggc gac agc gcg cag acg tat acg ttc aaa aac gcg att	432
Val Val Asn Gly Asp Ser Ala Gln Thr Tyr Thr Phe Lys Asn Ala Ile	
130 135 140	
atc gcc acc ggc tcg cgc ccg att gag ctg ccg aac ttc aag ttt tcc	480
Ile Ala Thr Gly Ser Arg Pro Ile Glu Leu Pro Asn Phe Lys Phe Ser	
145 150 155 160	
aac cgc att ctt gac tcg acg gga gct ctc aac ctt ggg gaa gtg ccg	528
Asn Arg Ile Leu Asp Ser Thr Gly Ala Leu Asn Leu Gly Glu Val Pro	
165 170 175	
aaa tcg ctc gtg gtc atc ggc ggc ggc tat att ggc atc gaa ctc ggt	576
Lys Ser Leu Val Val Ile Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Ile Glu Leu Gly	
180 185 190	

ES 2 786 226 T3

acg gct tac gcc aac ttt ggg acg aaa gtg acc att tta gaa gga gcc Thr Ala Tyr Ala Asn Phe Gly Thr Lys Val Thr Ile Leu Glu Gly Ala 195 200 205	624
ggc gaa att ttg tcc ggt ttt gag aag caa atg gct gcc atc atc aag Gly Glu Ile Leu Ser Gly Phe Glu Lys Gln Met Ala Ala Ile Ile Lys 210 215 220	672
aag cgc ctg aag aaa aaa ggc gtt gaa gtc gtg acg aac gca ttg gcg Lys Arg Leu Lys Lys Lys Gly Val Glu Val Val Thr Asn Ala Leu Ala 225 230 235 240	720
aaa ggg gcc gaa gaa cgc gaa gac ggc gtc acg gtc acg tat gag gcg Lys Gly Ala Glu Glu Arg Glu Asp Gly Val Thr Val Thr Tyr Glu Ala 245 250 255	768
aat ggt gaa acg aaa acg att gac gcc gac tat gtg ctc gtc acc gtc Asn Gly Glu Thr Lys Thr Ile Asp Ala Asp Tyr Val Leu Val Thr Val 260 265 270	816
ggc cgc cgt ccg aat aca gat gaa ctt ggt ctt gaa caa atc ggc atc Gly Arg Arg Pro Asn Thr Asp Glu Leu Gly Leu Glu Gln Ile Gly Ile 275 280 285	864
aaa atg acg aac cgc ggc ttg att gaa gtg gac caa caa tgc cgg aca Lys Met Thr Asn Arg Gly Leu Ile Glu Val Asp Gln Gln Cys Arg Thr 290 295 300	912
agc gtg ccg aac att ttt gcg atc ggc gac atc gtt cca ggt ccg gcg Ser Val Pro Asn Ile Phe Ala Ile Gly Asp Ile Val Pro Gly Pro Ala 305 310 315 320	960
ctc gcc cat aaa gcg tcg tat gaa gga aaa gtg gct gcg gaa gct atc Leu Ala His Lys Ala Ser Tyr Glu Gly Lys Val Ala Ala Glu Ala Ile 325 330 335	1008
gcc ggc cat ccg tcg gca gtc gat tac gtg gcc att cca gct gtt gtc Ala Gly His Pro Ser Ala Val Asp Tyr Val Ala Ile Pro Ala Val Val 340 345 350	1056
ttc tcc gat ccg gaa tgc gcg tcg gtc ggc tat ttt gag cag cag gcg Phe Ser Asp Pro Glu Cys Ala Ser Val Gly Tyr Phe Glu Gln Gln Ala 355 360 365	1104
aaa gac gag ggc att gac gtc att gcc gcg aaa ttc ccg ttt gct gcc Lys Asp Glu Gly Ile Asp Val Ile Ala Ala Lys Phe Pro Phe Ala Ala 370 375 380	1152
aac ggc cgc gcc ttg gcg ctg aac gat acg gac ggc ttc ttg aag ctc Asn Gly Arg Ala Leu Ala Leu Asn Asp Thr Asp Gly Phe Leu Lys Leu 385 390 395 400	1200
gtt gtc cgc aaa gag gac ggc gtc atc att ggt gcg caa atc atc ggt Val Val Arg Lys Glu Asp Gly Val Ile Ile Gly Ala Gln Ile Ile Gly 405 410 415	1248
cca aat gct tct gac atg atc gcc gag ctt ggg ctc gcc att gaa gcc Pro Asn Ala Ser Asp Met Ile Ala Glu Leu Gly Leu Ala Ile Glu Ala 420 425 430	1296
ggc atg acg gcg gaa gac atc gct ttg acg atc cat gcc cat ccg acg	1344

ES 2 786 226 T3

Gly Met Thr Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Ile His Ala His Pro Thr
 435 440 445
 ctt ggc gaa atc gcc atg gaa gcg gcg gaa gtg gcg ctt ggc aca ccg 1392
 Leu Gly Glu Ile Ala Met Glu Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Thr Pro
 450 455 460
 att cat atc att acg aag taa 1413
 Ile His Ile Ile Thr Lys
 465 470

<210> 5
 5 <211> 470
 <212> PRT
 <213> *Geobacillus stearothermophilus*

<400> 5

10

Met Val Val Gly Asp Phe Ala Ile Glu Thr Glu Thr Leu Val Val Gly
 1 5 10 15
 Ala Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Ala Gln Leu Gly
 20 25 30
 Gln Lys Val Thr Ile Val Glu Lys Gly Asn Leu Gly Gly Val Cys Leu
 35 40 45
 Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Ile Ser Ala Ser His Arg
 50 55 60
 Tyr Glu Gln Ala Lys His Ser Glu Glu Met Gly Ile Lys Ala Glu Asn
 65 70 75 80
 Val Thr Ile Asp Phe Ala Lys Val Gln Glu Trp Lys Ala Ser Val Val
 85 90 95
 Lys Lys Leu Thr Gly Gly Val Glu Gly Leu Leu Lys Gly Asn Lys Val
 100 105 110
 Glu Ile Val Lys Gly Glu Ala Tyr Phe Val Asp Ala Asn Thr Val Arg
 115 120 125
 Val Val Asn Gly Asp Ser Ala Gln Thr Tyr Thr Phe Lys Asn Ala Ile
 130 135 140
 Ile Ala Thr Gly Ser Arg Pro Ile Glu Leu Pro Asn Phe Lys Phe Ser
 145 150 155 160
 Asn Arg Ile Leu Asp Ser Thr Gly Ala Leu Asn Leu Gly Glu Val Pro
 165 170 175
 Lys Ser Leu Val Val Ile Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Ile Glu Leu Gly
 180 185 190
 Thr Ala Tyr Ala Asn Phe Gly Thr Lys Val Thr Ile Leu Glu Gly Ala
 195 200 205
 Gly Glu Ile Leu Ser Gly Phe Glu Lys Gln Met Ala Ala Ile Ile Lys
 210 215 220
 Lys Arg Leu Lys Lys Lys Gly Val Glu Val Val Thr Asn Ala Leu Ala
 225 230 235 240
 Lys Gly Ala Glu Glu Arg Glu Asp Gly Val Thr Val Thr Tyr Glu Ala
 245 250 255
 Asn Gly Glu Thr Lys Thr Ile Asp Ala Asp Tyr Val Leu Val Thr Val
 260 265 270
 Gly Arg Arg Pro Asn Thr Asp Glu Leu Gly Leu Glu Gln Ile Gly Ile
 275 280 285
 Lys Met Thr Asn Arg Gly Leu Ile Glu Val Asp Gln Gln Cys Arg Thr
 290 295 300
 Ser Val Pro Asn Ile Phe Ala Ile Gly Asp Ile Val Pro Gly Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Ala His Lys Ala Ser Tyr Glu Gly Lys Val Ala Ala Glu Ala Ile
 325 330 335
 Ala Gly His Pro Ser Ala Val Asp Tyr Val Ala Ile Pro Ala Val Val

ES 2 786 226 T3

```

                340                345                350
Phe Ser Asp Pro Glu Cys Ala Ser Val Gly Tyr Phe Glu Gln Gln Ala
      355                360                365
Lys Asp Glu Gly Ile Asp Val Ile Ala Ala Lys Phe Pro Phe Ala Ala
      370                375                380
Asn Gly Arg Ala Leu Ala Leu Asn Asp Thr Asp Gly Phe Leu Lys Leu
385                390                395                400
Val Val Arg Lys Glu Asp Gly Val Ile Ile Gly Ala Gln Ile Ile Gly
      405                410                415
Pro Asn Ala Ser Asp Met Ile Ala Glu Leu Gly Leu Ala Ile Glu Ala
      420                425                430
Gly Met Thr Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Ile His Ala His Pro Thr
      435                440                445
Leu Gly Glu Ile Ala Met Glu Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Thr Pro
      450                455                460
Ile His Ile Ile Thr Lys
465                470

```

5 <210> 6
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Dihidrolipoamida deshidrogenasa mutada de Geobacillus stearothermophilus

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1413)

<400> 6

```

atg gta gtt ggc gat ttt gca att gaa acg gaa acg ctt gtc gtc ggc      48
Met Val Val Gly Asp Phe Ala Ile Glu Thr Glu Thr Leu Val Val Gly
1                5                10                15

gcc ggt cct ggc ggg tat gtc gcc gcc atc cgc gcc gcg cag ctc gga      96
Ala Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Ala Gln Leu Gly
      20                25                30

caa aaa gtg acg att gtg gaa aag ggc aat tta ggc ggc gtc tgc tta      144
Gln Lys Val Thr Ile Val Glu Lys Gly Asn Leu Gly Gly Val Cys Leu
      35                40                45

aat gtt ggc tgc atc ccg tca aag gcg ctg atc tcc gca agc cat cgc      192
Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Ile Ser Ala Ser His Arg
      50                55                60

tat gag cag gcg aag cat tcc gaa gaa atg ggc att aag gcg gag aac      240
Tyr Glu Gln Ala Lys His Ser Glu Glu Met Gly Ile Lys Ala Glu Asn
65                70                75                80

gtc acc atc gat ttt gcc aaa gtg caa gaa tgg aaa gca agc gtc gtg      288
Val Thr Ile Asp Phe Ala Lys Val Gln Glu Trp Lys Ala Ser Val Val
      85                90                95

aaa aaa tta acg ggc ggc gtc gaa ggg ctg tta aaa gga aac aaa gta      336
Lys Lys Leu Thr Gly Gly Val Glu Gly Leu Leu Lys Gly Asn Lys Val
      100                105                110

gag atc gtc aaa ggg gaa gcg tat ttt gtc gac gcc aat acg gtg cgt      384

```

ES 2 786 226 T3

Glu	Ile	Val	Lys	Gly	Glu	Ala	Tyr	Phe	Val	Asp	Ala	Asn	Thr	Val	Arg		
		115					120					125					
gtc	gtc	aac	ggc	gac	agc	gcg	cag	acg	tat	acg	ttc	aaa	aac	gcg	att		432
Val	Val	Asn	Gly	Asp	Ser	Ala	Gln	Thr	Tyr	Thr	Phe	Lys	Asn	Ala	Ile		
	130					135				140							
atc	gcc	acc	ggc	tcg	cgc	ccg	att	gag	ctg	ccg	aac	ttc	aag	ttt	tcc		480
Ile	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Pro	Ile	Glu	Leu	Pro	Asn	Phe	Lys	Phe	Ser		
145					150					155					160		
aac	cgc	att	ctt	gac	tcg	acg	gga	gct	ctc	aac	ctt	ggg	gaa	gtg	ccg		528
Asn	Arg	Ile	Leu	Asp	Ser	Thr	Gly	Ala	Leu	Asn	Leu	Gly	Glu	Val	Pro		
				165					170					175			
aaa	tcg	ctc	gtg	gtc	atc	ggc	ggc	ggc	tat	att	gcg	atc	gaa	ctc	gcg		576
Lys	Ser	Leu	Val	Val	Ile	Gly	Gly	Gly	Tyr	Ile	Ala	Ile	Glu	Leu	Ala		
		180						185					190				
acg	gct	tac	gcc	aac	ttt	ggg	acg	aaa	gtg	acc	att	tta	gtg	cgt	aaa		624
Thr	Ala	Tyr	Ala	Asn	Phe	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Ile	Leu	Val	Arg	Lys		
		195					200					205					
ggc	gaa	att	ttg	cgt	ggt	ttt	gag	aag	caa	atg	gct	gcc	atc	atc	aag		672
Gly	Glu	Ile	Leu	Arg	Gly	Phe	Glu	Lys	Gln	Met	Ala	Ala	Ile	Ile	Lys		
	210					215					220						
aag	cgc	ctg	aag	aaa	aaa	ggc	ggt	gaa	gtc	gtg	acg	aac	gca	ttg	gcg		720
Lys	Arg	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	Val	Glu	Val	Val	Thr	Asn	Ala	Leu	Ala		
225					230					235					240		
aaa	ggg	gcc	gaa	gaa	cgc	gaa	gac	ggc	gtc	acg	gtc	acg	tat	gag	gcg		768
Lys	Gly	Ala	Glu	Glu	Arg	Glu	Asp	Gly	Val	Thr	Val	Thr	Tyr	Glu	Ala		
				245					250					255			
aat	ggt	gaa	acg	aaa	acg	att	gac	gcc	gac	tat	gtg	ctc	gtc	acc	gtc		816
Asn	Gly	Glu	Thr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ala	Asp	Tyr	Val	Leu	Val	Thr	Val		
			260					265					270				
ggc	cgc	cgt	ccg	aat	aca	gat	gaa	ctt	ggt	ctt	gaa	caa	atc	ggc	atc		864
Gly	Arg	Arg	Pro	Asn	Thr	Asp	Glu	Leu	Gly	Leu	Glu	Gln	Ile	Gly	Ile		
		275				280						285					
aaa	atg	acg	aac	cgc	ggc	ttg	att	gaa	gtg	gac	caa	caa	tgc	cgg	aca		912
Lys	Met	Thr	Asn	Arg	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Asp	Gln	Gln	Cys	Arg	Thr		
	290					295					300						
agc	gtg	ccg	aac	att	ttt	gcg	atc	ggc	gac	atc	ggt	cca	ggt	ccg	gcg		960
Ser	Val	Pro	Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Gly	Asp	Ile	Val	Pro	Gly	Pro	Ala		
305					310					315					320		
ctc	gcc	cat	aaa	gcg	tcg	tat	gaa	gga	aaa	gtg	gct	gcg	gaa	gct	atc		1008
Leu	Ala	His	Lys	Ala	Ser	Tyr	Glu	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Glu	Ala	Ile		
				325					330					335			
gcc	ggc	cat	ccg	tcg	gca	gtc	gat	tac	gtg	gcc	att	cca	gct	ggt	gtc		1056
Ala	Gly	His	Pro	Ser	Ala	Val	Asp	Tyr	Val	Ala	Ile	Pro	Ala	Val	Val		
			340					345					350				
ttc	tcc	gat	ccg	gaa	tgc	gcg	tcg	gtc	ggc	tat	ttt	gag	cag	cag	gcg		1104
Phe	Ser	Asp	Pro	Glu	Cys	Ala	Ser	Val	Gly	Tyr	Phe	Glu	Gln	Gln	Ala		

ES 2 786 226 T3

355	360	365	
aaa gac gag ggc att gac gtc att gcc gcg aaa ttc ccg ttt gct gcc			1152
Lys Asp Glu Gly Ile Asp Val Ile Ala Ala Lys Phe Pro Phe Ala Ala			
370	375	380	
aac ggc cgc gcc ttg gcg ctg aac gat acg gac ggc ttc ttg aag ctc			1200
Asn Gly Arg Ala Leu Ala Leu Asn Asp Thr Asp Gly Phe Leu Lys Leu			
385	390	395	400
gtt gtc cgc aaa gag gac ggc gtc atc att ggt gcg caa atc atc ggt			1248
Val Val Arg Lys Glu Asp Gly Val Ile Ile Gly Ala Gln Ile Ile Gly			
405	410	415	
cca aat gct tct gac atg atc gcc gag ctt ggg ctc gcc att gaa gcc			1296
Pro Asn Ala Ser Asp Met Ile Ala Glu Leu Gly Leu Ala Ile Glu Ala			
420	425	430	
ggc atg acg gcg gaa gac atc gct ttg acg atc cat gcc cat ccg acg			1344
Gly Met Thr Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Ile His Ala His Pro Thr			
435	440	445	
ctt ggc gaa atc gcc atg gaa gcg gcg gaa gtg gcg ctt ggc aca ccg			1392
Leu Gly Glu Ile Ala Met Glu Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Thr Pro			
450	455	460	
att cat atc att acg aag taa			1413
Ile His Ile Ile Thr Lys			
465	470		

<210> 7
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 7

Met Val Val Gly Asp Phe Ala Ile Glu Thr Glu Thr Leu Val Val Gly																		
1				5				10						15				
Ala Gly Pro Gly Gly Tyr Val Ala Ala Ile Arg Ala Ala Gln Leu Gly																		
			20					25						30				
Gln Lys Val Thr Ile Val Glu Lys Gly Asn Leu Gly Gly Val Cys Leu																		
		35					40						45					
Asn Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Ile Ser Ala Ser His Arg																		
	50					55							60					
Tyr Glu Gln Ala Lys His Ser Glu Glu Met Gly Ile Lys Ala Glu Asn																		
	65				70						75							80
Val Thr Ile Asp Phe Ala Lys Val Gln Glu Trp Lys Ala Ser Val Val																		
			85															95
Lys Lys Leu Thr Gly Gly Val Glu Gly Leu Leu Lys Gly Asn Lys Val																		
			100															110
Glu Ile Val Lys Gly Glu Ala Tyr Phe Val Asp Ala Asn Thr Val Arg																		
			115															125
Val Val Asn Gly Asp Ser Ala Gln Thr Tyr Thr Phe Lys Asn Ala Ile																		
			130															140
Ile Ala Thr Gly Ser Arg Pro Ile Glu Leu Pro Asn Phe Lys Phe Ser																		
			145															160
Asn Arg Ile Leu Asp Ser Thr Gly Ala Leu Asn Leu Gly Glu Val Pro																		

ES 2 786 226 T3

165 170 175
 Lys Ser Leu Val Ile Gly Gly Gly Tyr Ile Ala Ile Glu Leu Ala
 180 185 190
 Thr Ala Tyr Ala Asn Phe Gly Thr Lys Val Thr Ile Leu Val Arg Lys
 195 200 205
 Gly Glu Ile Leu Arg Gly Phe Glu Lys Gln Met Ala Ala Ile Ile Lys
 210 215 220
 Lys Arg Leu Lys Lys Lys Gly Val Glu Val Val Thr Asn Ala Leu Ala
 225 230 235 240
 Lys Gly Ala Glu Glu Arg Glu Asp Gly Val Thr Val Thr Tyr Glu Ala
 245 250 255
 Asn Gly Glu Thr Lys Thr Ile Asp Ala Asp Tyr Val Leu Val Thr Val
 260 265 270
 Gly Arg Arg Pro Asn Thr Asp Glu Leu Gly Leu Glu Gln Ile Gly Ile
 275 280 285
 Lys Met Thr Asn Arg Gly Leu Ile Glu Val Asp Gln Gln Cys Arg Thr
 290 295 300
 Ser Val Pro Asn Ile Phe Ala Ile Gly Asp Ile Val Pro Gly Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Ala His Lys Ala Ser Tyr Glu Gly Lys Val Ala Ala Glu Ala Ile
 325 330 335
 Ala Gly His Pro Ser Ala Val Asp Tyr Val Ala Ile Pro Ala Val Val
 340 345 350
 Phe Ser Asp Pro Glu Cys Ala Ser Val Gly Tyr Phe Glu Gln Gln Ala
 355 360 365
 Lys Asp Glu Gly Ile Asp Val Ile Ala Ala Lys Phe Pro Phe Ala Ala
 370 375 380
 Asn Gly Arg Ala Leu Ala Leu Asn Asp Thr Asp Gly Phe Leu Lys Leu
 385 390 395 400
 Val Val Arg Lys Glu Asp Gly Val Ile Ile Gly Ala Gln Ile Ile Gly
 405 410 415
 Pro Asn Ala Ser Asp Met Ile Ala Glu Leu Gly Leu Ala Ile Glu Ala
 420 425 430
 Gly Met Thr Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Ile His Ala His Pro Thr
 435 440 445
 Leu Gly Glu Ile Ala Met Glu Ala Ala Glu Val Ala Leu Gly Thr Pro
 450 455 460
 Ile His Ile Ile Thr Lys
 465 470

<210> 8
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 8

Met Ser Thr Leu Arg Leu Leu Ile Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Trp Phe
 1 5 10 15
 Asn Leu Ala Val Glu Glu Cys Ile Phe Arg Gln Met Pro Ala Thr Gln
 20 25 30
 Arg Val Leu Phe Leu Trp Arg Asn Ala Asp Thr Val Val Ile Gly Arg
 35 40 45
 Ala Gln Asn Pro Trp Lys Glu Cys Asn Thr Arg Arg Met Glu Glu Asp
 50 55 60
 Asn Val Arg Leu Ala Arg Arg Ser Ser Gly Gly Ala Val Phe His
 65 70 75 80
 Asp Leu Gly Asn Thr Cys Phe Thr Phe Met Ala Gly Lys Pro Glu Tyr
 85 90 95
 Asp Lys Thr Ile Ser Thr Ser Ile Val Leu Asn Ala Leu Asn Ala Leu
 100 105 110

10

ES 2 786 226 T3

Gly Val Ser Ala Glu Ala Ser Gly Arg Asn Asp Leu Val Val Lys Thr
 115 120 125
 Val Glu Gly Asp Arg Lys Val Ser Gly Ser Ala Tyr Arg Glu Thr Lys
 130 135 140
 Asp Arg Gly Phe His His Gly Thr Leu Leu Leu Asn Ala Asp Leu Ser
 145 150 155 160
 Arg Leu Ala Asn Tyr Leu Asn Pro Asp Lys Lys Lys Leu Ala Ala Lys
 165 170 175
 Gly Ile Thr Ser Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Leu Thr Glu Leu Leu
 180 185 190
 Pro Gly Ile Thr His Glu Gln Val Cys Glu Ala Ile Thr Glu Ala Phe
 195 200 205
 Phe Ala His Tyr Gly Glu Arg Val Glu Ala Glu Ile Ser Pro Asn
 210 215 220
 Lys Thr Pro Asp Leu Pro Asn Phe Ala Glu Thr Phe Ala Arg Gln Ser
 225 230 235 240
 Ser Trp Glu Trp Asn Phe Gly Gln Ala Pro Ala Phe Ser His Leu Leu
 245 250 255
 Asp Glu Arg Phe Thr Trp Gly Gly Val Glu Leu His Phe Asp Val Glu
 260 265 270
 Lys Gly His Ile Thr Arg Ala Gln Val Phe Thr Asp Ser Leu Asn Pro
 275 280 285
 Ala Pro Leu Glu Ala Leu Ala Gly Arg Leu Gln Gly Cys Leu Tyr Arg
 290 295 300
 Ala Asp Met Leu Gln Gln Glu Cys Glu Ala Leu Leu Val Asp Phe Pro
 305 310 315 320
 Glu Gln Glu Lys Glu Leu Arg Glu Leu Ser Ala Trp Met Ala Gly Ala
 325 330 335
 Val Arg

<210> 9
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> *Lactococcus lactis*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1341)

10

<400> 9

atg aaa atc gta gtt atc ggt acg aac cac gca ggc att gct aca gca 48
 Met Lys Ile Val Val Ile Gly Thr Asn His Ala Gly Ile Ala Thr Ala
 1 5 10 15
 aat aca tta att gat cga tat cca ggc cat gag att gtt atg att gac 96
 Asn Thr Leu Ile Asp Arg Tyr Pro Gly His Glu Ile Val Met Ile Asp
 20 25 30
 cgt aac agt aat atg agt tac ttg ggg tgt ggg aca gct att tgg gtc 144
 Arg Asn Ser Asn Met Ser Tyr Leu Gly Cys Gly Thr Ala Ile Trp Val
 35 40 45
 gga aga caa att gaa aaa cca gat gag ctg ttt tat gcc aaa gca gaa 192
 Gly Arg Gln Ile Glu Lys Pro Asp Glu Leu Phe Tyr Ala Lys Ala Glu
 50 55 60
 gat ttt gaa aaa aag gga gta aag ata tta aca gaa aca gaa gtt tca 240
 Asp Phe Glu Lys Lys Gly Val Lys Ile Leu Thr Glu Thr Glu Val Ser
 65 70 75 80
 gaa att gac ttt act aat aaa atg att tat gcc aag tca aaa act gga 288

15

ES 2 786 226 T3

Glu	Ile	Asp	Phe	Thr	Asn	Lys	Met	Ile	Tyr	Ala	Lys	Ser	Lys	Thr	Gly		
				85					90					95			
gaa	aag	att	aca	gaa	agt	tat	gat	aaa	ctc	gtt	ctg	gca	aca	ggt	tca		336
Glu	Lys	Ile	Thr	Glu	Ser	Tyr	Asp	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser		
			100					105						110			
cgt	cca	att	att	cct	aac	ttg	cca	gga	aaa	gat	ctt	aaa	ggc	att	cat		384
Arg	Pro	Ile	Ile	Pro	Asn	Leu	Pro	Gly	Lys	Asp	Leu	Lys	Gly	Ile	His		
		115					120					125					
ttt	tta	aaa	ctt	ttt	caa	gaa	ggg	caa	gcc	att	gac	gaa	gag	ttt	gct		432
Phe	Leu	Lys	Leu	Phe	Gln	Glu	Gly	Gln	Ala	Ile	Asp	Glu	Glu	Phe	Ala		
	130					135					140						
aag	aat	gat	gtg	aaa	cgg	att	gct	gtg	att	ggt	gct	ggt	tat	att	ggg		480
Lys	Asn	Asp	Val	Lys	Arg	Ile	Ala	Val	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Ile	Gly		
145					150					155					160		
aca	gaa	att	gct	gaa	gct	gcc	aaa	cgt	cgt	gga	aaa	gaa	gtc	cta	ctt		528
Thr	Glu	Ile	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Arg	Arg	Gly	Lys	Glu	Val	Leu	Leu		
				165					170						175		
ttt	gat	gca	gaa	agt	act	tca	ctt	gct	tca	tat	tat	gat	gaa	gag	ttt		576
Phe	Asp	Ala	Glu	Ser	Thr	Ser	Leu	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Glu	Phe		
			180					185					190				
gct	aaa	ggg	atg	gat	gaa	aat	ctt	gcc	caa	cat	gga	att	gaa	ctc	cat		624
Ala	Lys	Gly	Met	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Gln	His	Gly	Ile	Glu	Leu	His		
		195					200					205					
ttt	ggg	gaa	tta	gct	caa	gag	ttt	aag	gca	aat	gaa	aaa	ggt	cat	gta		672
Phe	Gly	Glu	Leu	Ala	Gln	Glu	Phe	Lys	Ala	Asn	Glu	Lys	Gly	His	Val		
	210					215					220						
tca	cag	att	gta	act	aat	aaa	tca	act	tat	gat	gtt	gac	ctc	gtt	att		720
Ser	Gln	Ile	Val	Thr	Asn	Lys	Ser	Thr	Tyr	Asp	Val	Asp	Leu	Val	Ile		
225					230					235					240		
aat	tgt	att	ggc	ttt	aca	gcc	aat	agt	gca	ttg	gct	ggt	gaa	cat	tta		768
Asn	Cys	Ile	Gly	Phe	Thr	Ala	Asn	Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	His	Leu		
				245					250					255			
gaa	acc	ttt	aaa	aat	gga	gca	atc	aaa	gtg	gat	aaa	cat	caa	caa	agt		816
Glu	Thr	Phe	Lys	Asn	Gly	Ala	Ile	Lys	Val	Asp	Lys	His	Gln	Gln	Ser		
			260					265					270				
agt	gac	cca	gat	gtt	tct	gct	gta	gga	gat	gtt	gcc	aca	atc	tat	tct		864
Ser	Asp	Pro	Asp	Val	Ser	Ala	Val	Gly	Asp	Val	Ala	Thr	Ile	Tyr	Ser		
		275					280					285					
aat	gct	tta	caa	gac	ttc	acc	tac	att	gcc	ctt	gcc	tca	aac	gct	gtt		912
Asn	Ala	Leu	Gln	Asp	Phe	Thr	Tyr	Ile	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn	Ala	Val		
	290					295					300						
cgc	tca	ggg	att	gtt	gct	ggg	cat	aat	att	gga	gga	aaa	tca	ata	gag		960
Arg	Ser	Gly	Ile	Val	Ala	Gly	His	Asn	Ile	Gly	Gly	Lys	Ser	Ile	Glu		
305					310					315					320		
tct	gtt	ggt	gta	caa	ggt	tct	aat	gga	atc	tct	att	ttt	ggt	tac	aat		1008
Ser	Val	Gly	Val	Gln	Gly	Ser	Asn	Gly	Ile	Ser	Ile	Phe	Gly	Tyr	Asn		

ES 2 786 226 T3

	325		330		335	
atg act tct acg ggc ttg tcg gtt aaa gct gcg aaa aaa atc ggc cta						1056
Met Thr Ser Thr Gly Leu Ser Val Lys Ala Ala Lys Lys Ile Gly Leu	340		345		350	
gaa gtt tca ttt agt gat ttt gaa gat aag caa aaa gca tgg ttc ctt						1104
Glu Val Ser Phe Ser Asp Phe Glu Asp Lys Gln Lys Ala Trp Phe Leu	355		360		365	
cat gaa aat aat gat agt gtg aaa att cgt atc gtt tat gaa aca aaa						1152
His Glu Asn Asn Asp Ser Val Lys Ile Arg Ile Val Tyr Glu Thr Lys	370		375		380	
aat cgc aga att att ggt gct caa ctt gct agc aag agt gaa ata att						1200
Asn Arg Arg Ile Ile Gly Ala Gln Leu Ala Ser Lys Ser Glu Ile Ile	385		390		395	400
gca gga aat att aat atg ttt agt tta gct att caa gaa aag aaa acg						1248
Ala Gly Asn Ile Asn Met Phe Ser Leu Ala Ile Gln Glu Lys Lys Thr	405		410		415	
att gat gaa tta gcc tta ctt gat tta ttc ttc tta cca cac ttc aat						1296
Ile Asp Glu Leu Ala Leu Leu Asp Leu Phe Phe Leu Pro His Phe Asn	420		425		430	
agt cca tat aat tac atg act gtt gca gct tta aat gca aaa taa						1341
Ser Pro Tyr Asn Tyr Met Thr Val Ala Ala Leu Asn Ala Lys	435		440		445	

<210> 10
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Lactococcus lactis

5

<400> 10

10

Met Lys Ile Val Val Ile Gly Thr Asn His Ala Gly Ile Ala Thr Ala																
1			5					10							15	
Asn Thr Leu Ile Asp Arg Tyr Pro Gly His Glu Ile Val Met Ile Asp			20				25							30		
Arg Asn Ser Asn Met Ser Tyr Leu Gly Cys Gly Thr Ala Ile Trp Val			35			40							45			
Gly Arg Gln Ile Glu Lys Pro Asp Glu Leu Phe Tyr Ala Lys Ala Glu			50			55							60			
Asp Phe Glu Lys Lys Gly Val Lys Ile Leu Thr Glu Thr Glu Val Ser			65			70							75			80
Glu Ile Asp Phe Thr Asn Lys Met Ile Tyr Ala Lys Ser Lys Thr Gly			85										90			95
Glu Lys Ile Thr Glu Ser Tyr Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Ser			100										105			110
Arg Pro Ile Ile Pro Asn Leu Pro Gly Lys Asp Leu Lys Gly Ile His			115										120			125
Phe Leu Lys Leu Phe Gln Glu Gly Gln Ala Ile Asp Glu Glu Phe Ala			130			135							140			
Lys Asn Asp Val Lys Arg Ile Ala Val Ile Gly Ala Gly Tyr Ile Gly			145			150							155			160
Thr Glu Ile Ala Glu Ala Ala Lys Arg Arg Gly Lys Glu Val Leu Leu			165										170			175
Phe Asp Ala Glu Ser Thr Ser Leu Ala Ser Tyr Tyr Asp Glu Glu Phe			180										185			190

ES 2 786 226 T3

Ala Lys Gly Met Asp Glu Asn Leu Ala Gln His Gly Ile Glu Leu His
 195 200 205
 Phe Gly Glu Leu Ala Gln Glu Phe Lys Ala Asn Glu Lys Gly His Val
 210 215 220
 Ser Gln Ile Val Thr Asn Lys Ser Thr Tyr Asp Val Asp Leu Val Ile
 225 230 235 240
 Asn Cys Ile Gly Phe Thr Ala Asn Ser Ala Leu Ala Gly Glu His Leu
 245 250 255
 Glu Thr Phe Lys Asn Gly Ala Ile Lys Val Asp Lys His Gln Gln Ser
 260 265 270
 Ser Asp Pro Asp Val Ser Ala Val Gly Asp Val Ala Thr Ile Tyr Ser
 275 280 285
 Asn Ala Leu Gln Asp Phe Thr Tyr Ile Ala Leu Ala Ser Asn Ala Val
 290 295 300
 Arg Ser Gly Ile Val Ala Gly His Asn Ile Gly Gly Lys Ser Ile Glu
 305 310 315 320
 Ser Val Gly Val Gln Gly Ser Asn Gly Ile Ser Ile Phe Gly Tyr Asn
 325 330 335
 Met Thr Ser Thr Gly Leu Ser Val Lys Ala Ala Lys Lys Ile Gly Leu
 340 345 350
 Glu Val Ser Phe Ser Asp Phe Glu Asp Lys Gln Lys Ala Trp Phe Leu
 355 360 365
 His Glu Asn Asn Asp Ser Val Lys Ile Arg Ile Val Tyr Glu Thr Lys
 370 375 380
 Asn Arg Arg Ile Ile Gly Ala Gln Leu Ala Ser Lys Ser Glu Ile Ile
 385 390 395 400
 Ala Gly Asn Ile Asn Met Phe Ser Leu Ala Ile Gln Glu Lys Lys Thr
 405 410 415
 Ile Asp Glu Leu Ala Leu Leu Asp Leu Phe Phe Leu Pro His Phe Asn
 420 425 430
 Ser Pro Tyr Asn Tyr Met Thr Val Ala Ala Leu Asn Ala Lys
 435 440 445

<210> 11
 <211> 393
 5 <212> PRT
 <213> *Ralstonia eutropha*

<400> 11

Met Thr Asp Val Val Ile Val Ser Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Lys
 1 5 10 15
 Phe Gly Gly Ser Leu Ala Lys Ile Pro Ala Pro Glu Leu Gly Ala Val
 20 25 30
 Val Ile Lys Ala Ala Leu Glu Arg Ala Gly Val Lys Pro Glu Gln Val
 35 40 45
 Ser Glu Val Ile Met Gly Gln Val Leu Thr Ala Gly Ser Gly Gln Asn
 50 55 60
 Pro Ala Arg Gln Ala Ala Ile Lys Ala Gly Leu Pro Ala Met Val Pro
 65 70 75 80
 Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Lys Ala Val Met
 85 90 95
 Leu Ala Ala Asn Ala Ile Met Ala Gly Asp Ala Glu Ile Val Val Ala
 100 105 110
 Gly Gly Gln Glu Asn Met Ser Ala Ala Pro His Val Leu Pro Gly Ser
 115 120 125
 Arg Asp Gly Phe Arg Met Gly Asp Ala Lys Leu Val Asp Thr Met Ile
 130 135 140
 Val Asp Gly Leu Trp Asp Val Tyr Asn Gln Tyr His Met Gly Ile Thr
 145 150 155 160
 Ala Glu Asn Val Ala Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Arg Glu Ala Gln Asp

ES 2 786 226 T3

165 170 175
 Glu Phe Ala Val Gly Ser Gln Asn Lys Ala Glu Ala Ala Gln Lys Ala
 180 185 190
 Gly Lys Phe Asp Glu Glu Ile Val Pro Val Leu Ile Pro Gln Arg Lys
 195 200 205
 Gly Asp Pro Val Ala Phe Lys Thr Asp Glu Phe Val Arg Gln Gly Ala
 210 215 220
 Thr Leu Asp Ser Met Ser Gly Leu Lys Pro Ala Phe Asp Lys Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Val Thr Ala Ala Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Gly Ala Ala Ala
 245 250 255
 Val Val Val Met Ser Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Gly Leu Thr Pro
 260 265 270
 Leu Ala Thr Ile Lys Ser Tyr Ala Asn Ala Gly Val Asp Pro Lys Val
 275 280 285
 Met Gly Met Gly Pro Val Pro Ala Ser Lys Arg Ala Leu Ser Arg Ala
 290 295 300
 Glu Trp Thr Pro Gln Asp Leu Asp Leu Met Glu Ile Asn Glu Ala Phe
 305 310 315 320
 Ala Ala Gln Ala Leu Ala Val His Gln Gln Met Gly Trp Asp Thr Ser
 325 330 335
 Lys Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Ile Gly His Pro Ile Gly
 340 345 350
 Ala Ser Gly Cys Arg Ile Leu Val Thr Leu Leu His Glu Met Lys Arg
 355 360 365
 Arg Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Met
 370 375 380
 Gly Val Ala Leu Ala Val Glu Arg Lys
 385 390

<210> 12
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> *Ralstonia eutropha*

<400> 12

Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
 1 5 10 15
 Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
 20 25 30
 Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln
 35 40 45
 Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp
 50 55 60
 Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly
 65 70 75 80
 Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val
 85 90 95
 Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn
 100 105 110
 Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala
 115 120 125
 Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln
 130 135 140
 Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu
 145 150 155 160
 His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val
 165 170 175
 Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys
 180 185 190

ES 2 786 226 T3

Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val
 195 200 205
 Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu
 210 215 220
 Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn
 225 230 235 240
 Gly Gly Leu His Met Gly
 245

<210> 13
 <211> 605
 <212> PRT
 <213> Cupriavidus necator

5

<400> 13

Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Gly Gln Glu Glu Lys Thr
 1 5 10 15
 Thr Pro Phe Ser Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu
 20 25 30
 Glu Trp Ser Arg Gln Ala Gln Ala Asn Gly Arg Ala Ala Gly Gly Met
 35 40 45
 Pro Gly Ala Asp Ala Phe Ala Ala Leu Gly Ala Phe Pro Gly Gly Ala
 50 55 60
 Phe Pro Gly Ala Gly Phe Pro Gly Thr Ala Phe Pro Gly Ile Lys Ile
 65 70 75 80
 Ala Pro Ala Gln Leu Ala Glu Ile Gln Gln Arg Phe Met Gln Gly Phe
 85 90 95
 Thr Asp Leu Trp Arg Ala Met Ala Ala Gly Asp Gln Gln Gln Val Gln
 100 105 110
 Leu Thr Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Ser Asn Ala Pro
 115 120 125
 Tyr Arg Tyr Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Ala Met Ser
 130 135 140
 Glu Met Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile
 145 150 155 160
 Arg Phe Ala Val Thr Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe
 165 170 175
 Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Arg Leu Ile Glu Ser Asn Gly
 180 185 190
 Glu Ser Leu Arg Ala Gly Leu Arg Asn Met Leu Glu Asp Leu Thr Arg
 195 200 205
 Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn
 210 215 220
 Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Tyr Glu Asn Glu Tyr Phe Gln
 225 230 235 240
 Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Ala Lys Val His Ala Arg Pro Leu
 245 250 255
 Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
 260 265 270
 Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Ile Val Glu Gln Gly His Thr Val
 275 280 285
 Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Ala Arg Thr
 290 295 300
 Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Gly Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala
 305 310 315 320
 Arg Ala Ile Ser Gly Gln Pro Arg Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val
 325 330 335
 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Met Ala Gly Arg Gly
 340 345 350
 Glu Arg Pro Ala Gln Ser Leu Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe

10

ES 2 786 226 T3

```

          355                      360                      365
Ser Asp Thr Gly Val Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Ala His Val Gln
   370                      375                      380
Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Ala Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu
385                      390                      395                      400
Leu Arg Gly Ile Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn
   405                      410                      415
Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr
   420                      425                      430
Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu
   435                      440                      445
Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asp
   450                      455                      460
Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp
465                      470                      475                      480
Leu Gly Lys Ile Asp Val Pro Thr Tyr Leu Tyr Gly Ser Arg Glu Asp
   485                      490                      495
His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Arg Leu Leu Ser
   500                      505                      510
Asn Asp Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val
   515                      520                      525
Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Leu Asn Glu Asp
   530                      535                      540
Leu Pro Asp Ser Pro Asn Asp Trp Leu Ala Gly Ala Thr Glu Ala Pro
545                      550                      555                      560
Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Phe Ala Trp Leu Gly Lys His Ala Gly
   565                      570                      575
Ala Lys Lys Ala Ala Pro Thr Gln Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Pro Ala
580                      585                      590
Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala
   595                      600                      605

```

<210> 14

<211> 803

5

<212> PRT

<213> *Enterococcus faecalis*

<400> 14

```

Met Lys Thr Val Val Ile Ile Asp Ala Leu Arg Thr Pro Ile Gly Lys
1                      5                      10                      15
Tyr Lys Gly Ser Leu Ser Gln Val Ser Ala Val Asp Leu Gly Thr His
   20                      25                      30
Val Thr Thr Gln Leu Leu Lys Arg His Ser Thr Ile Ser Glu Glu Ile
   35                      40                      45
Asp Gln Val Ile Phe Gly Asn Val Leu Gln Ala Gly Asn Gly Gln Asn
   50                      55                      60
Pro Ala Arg Gln Ile Ala Ile Asn Ser Gly Leu Ser His Glu Ile Pro
65                      70                      75                      80
Ala Met Thr Val Asn Glu Val Cys Gly Ser Gly Met Lys Ala Val Ile
   85                      90                      95
Leu Ala Lys Gln Leu Ile Gln Leu Gly Glu Ala Glu Val Leu Ile Ala
  100                      105                      110
Gly Gly Ile Glu Asn Met Ser Gln Ala Pro Lys Leu Gln Arg Phe Asn
  115                      120                      125
Tyr Glu Thr Glu Ser Tyr Asp Ala Pro Phe Ser Ser Met Met Tyr Asp
  130                      135                      140
Gly Leu Thr Asp Ala Phe Ser Gly Gln Ala Met Gly Leu Thr Ala Glu
145                      150                      155                      160
Asn Val Ala Glu Lys Tyr His Val Thr Arg Glu Glu Gln Asp Gln Phe
   165                      170                      175

```

10

ES 2 786 226 T3

Ser Val His Ser Gln Leu Lys Ala Ala Gln Ala Gln Ala Glu Gly Ile
180 185 190
Phe Ala Asp Glu Ile Ala Pro Leu Glu Val Ser Gly Thr Leu Val Glu
195 200 205
Lys Asp Glu Gly Ile Arg Pro Asn Ser Ser Val Glu Lys Leu Gly Thr
210 215 220
Leu Lys Thr Val Phe Lys Glu Asp Gly Thr Val Thr Ala Gly Asn Ala
225 230 235 240
Ser Thr Ile Asn Asp Gly Ala Ser Ala Leu Ile Ile Ala Ser Gln Glu
245 250 255
Tyr Ala Glu Ala His Gly Leu Pro Tyr Leu Ala Ile Ile Arg Asp Ser
260 265 270
Val Glu Val Gly Ile Asp Pro Ala Tyr Met Gly Ile Ser Pro Ile Lys
275 280 285
Ala Ile Gln Lys Leu Leu Ala Arg Asn Gln Leu Thr Thr Glu Glu Ile
290 295 300
Asp Leu Tyr Glu Ile Asn Glu Ala Phe Ala Ala Thr Ser Ile Val Val
305 310 315 320
Gln Arg Glu Leu Ala Leu Pro Glu Glu Lys Val Asn Ile Tyr Gly Gly
325 330 335
Gly Ile Ser Leu Gly His Ala Ile Gly Ala Thr Gly Ala Arg Leu Leu
340 345 350
Thr Ser Leu Ser Tyr Gln Leu Asn Gln Lys Glu Lys Lys Tyr Gly Val
355 360 365
Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Leu Gly Leu Ala Met Leu Leu Glu
370 375 380
Arg Pro Gln Gln Lys Lys Asn Ser Arg Phe Tyr Gln Met Ser Pro Glu
385 390 395 400
Glu Arg Leu Ala Ser Leu Leu Asn Glu Gly Gln Ile Ser Ala Asp Thr
405 410 415
Lys Lys Glu Phe Glu Asn Thr Ala Leu Ser Ser Gln Ile Ala Asn His
420 425 430
Met Ile Glu Asn Gln Ile Ser Glu Thr Glu Val Pro Met Gly Val Gly
435 440 445
Leu His Leu Thr Val Asp Glu Thr Asp Tyr Leu Val Pro Met Ala Thr
450 455 460
Glu Glu Pro Ser Val Ile Ala Ala Leu Ser Asn Gly Ala Lys Ile Ala
465 470 475 480
Gln Gly Phe Lys Thr Val Asn Gln Gln Arg Leu Met Arg Gly Gln Ile
485 490 495
Val Phe Tyr Asp Val Ala Asp Ala Glu Ser Leu Ile Asp Glu Leu Gln
500 505 510
Val Arg Glu Thr Glu Ile Phe Gln Gln Ala Glu Leu Ser Tyr Pro Ser
515 520 525
Ile Val Lys Arg Gly Gly Gly Leu Arg Asp Leu Gln Tyr Arg Ala Phe
530 535 540
Asp Glu Ser Phe Val Ser Val Asp Phe Leu Val Asp Val Lys Asp Ala
545 550 555 560
Met Gly Ala Asn Ile Val Asn Ala Met Leu Glu Gly Val Ala Glu Leu
565 570 575
Phe Arg Glu Trp Phe Ala Glu Gln Lys Ile Leu Phe Ser Ile Leu Ser
580 585 590
Asn Tyr Ala Thr Glu Ser Val Val Thr Met Lys Thr Ala Ile Pro Val
595 600 605
Ser Arg Leu Ser Lys Gly Ser Asn Gly Arg Glu Ile Ala Glu Lys Ile
610 615 620
Val Leu Ala Ser Arg Tyr Ala Ser Leu Asp Pro Tyr Arg Ala Val Thr
625 630 635 640
His Asn Lys Gly Ile Met Asn Gly Ile Glu Ala Val Val Leu Ala Thr
645 650 655
Gly Asn Asp Thr Arg Ala Val Ser Ala Ser Cys His Ala Phe Ala Val

ES 2 786 226 T3

660 665 670
 Lys Glu Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Thr Ser Trp Thr Leu Asp Gly Glu
 675 680 685
 Gln Leu Ile Gly Glu Ile Ser Val Pro Leu Ala Leu Ala Thr Val Gly
 690 695 700
 Gly Ala Thr Lys Val Leu Pro Lys Ser Gln Ala Ala Asp Leu Leu
 705 710 715
 Ala Val Thr Asp Ala Lys Glu Leu Ser Arg Val Val Ala Ala Val Gly
 725 730 735
 Leu Ala Gln Asn Leu Ala Ala Leu Arg Ala Leu Val Ser Glu Gly Ile
 740 745 750
 Gln Lys Gly His Met Ala Leu Gln Ala Arg Ser Leu Ala Met Thr Val
 755 760 765
 Gly Ala Thr Gly Lys Glu Val Glu Ala Val Ala Gln Gln Leu Lys Arg
 770 775 780
 Gln Lys Thr Met Asn Gln Asp Arg Ala Leu Ala Ile Leu Asn Asp Leu
 785 790 795 800
 Arg Lys Gln

<210> 15
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Hidroximetilglutaril-CoA sintasa mutante de *Enterococcus faecalis*

10

<400> 15

Met Thr Ile Gly Ile Asp Lys Ile Ser Phe Phe Val Pro Pro Tyr Tyr
 1 5 10
 Ile Asp Met Thr Ala Leu Ala Glu Ala Arg Asn Val Asp Pro Gly Lys
 20 25 30
 Phe His Ile Gly Ile Gly Gln Asp Gln Met Ala Val Asn Pro Ile Ser
 35 40 45
 Gln Asp Ile Val Thr Phe Ala Ala Asn Ala Ala Glu Ala Ile Leu Thr
 50 55 60
 Lys Glu Asp Lys Glu Ala Ile Asp Met Val Ile Val Gly Thr Glu Ser
 65 70 75 80
 Ser Ile Asp Glu Ser Lys Ala Ala Ala Val Val Leu His Arg Leu Met
 85 90 95
 Gly Ile Gln Pro Phe Ala Arg Ser Phe Glu Ile Lys Glu Gly Cys Tyr
 100 105 110
 Gly Ala Thr Ala Gly Leu Gln Leu Ala Lys Asn His Val Ala Leu His
 115 120 125
 Pro Asp Lys Lys Val Leu Val Val Ala Ala Asp Ile Ala Lys Tyr Gly
 130 135 140
 Leu Asn Ser Gly Gly Glu Pro Thr Gln Gly Ala Val Ala Met
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Ser Glu Pro Arg Ile Leu Ala Leu Lys Glu Asp Asn Val
 165 170 175
 Met Leu Thr Gln Asp Ile Tyr Asp Phe Trp Arg Pro Thr Gly His Pro
 180 185 190
 Tyr Pro Met Val Asp Gly Pro Leu Ser Asn Glu Thr Tyr Ile Gln Ser
 195 200 205
 Phe Ala Gln Val Trp Asp Glu His Lys Lys Arg Thr Gly Leu Asp Phe
 210 215 220
 Ala Asp Tyr Asp Ala Leu Ala Phe His Ile Pro Tyr Thr Lys Met Gly
 225 230 235 240
 Lys Lys Ala Leu Leu Ala Lys Ile Ser Asp Gln Thr Glu Ala Glu Gln

ES 2 786 226 T3

				245					250				255			
Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Arg	Tyr	Glu	Glu	Ser	Ile	Ile	Tyr	Ser	Arg	Arg	
			260					265					270			
Val	Gly	Asn	Leu	Tyr	Thr	Ser	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gly	Leu	Ile	Ser	Leu	
		275					280					285				
Leu	Glu	Asn	Ala	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Gly	Asn	Gln	Ile	Gly	Leu	Phe	
	290					295					300					
Ser	Tyr	Gly	Ser	Gly	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Phe	Thr	Gly	Glu	Leu	Val	
305				310						315					320	
Ala	Gly	Tyr	Gln	Asn	His	Leu	Gln	Lys	Glu	Thr	His	Leu	Ala	Leu	Leu	
				325					330					335		
Asp	Asn	Arg	Thr	Glu	Leu	Ser	Ile	Ala	Glu	Tyr	Glu	Ala	Met	Phe	Ala	
			340					345					350			
Glu	Thr	Leu	Asp	Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Thr	Leu	Glu	Asp	Glu	Leu	Lys	
		355					360					365				
Tyr	Ser	Ile	Ser	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Val	Arg	Ser	Tyr	Arg	Asn		
	370					375					380					

<210> 16
 <211> 803
 <212> PRT
 <213> Enterococcus faecalis

5

<400> 16

Met	Lys	Thr	Val	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro	Ile	Gly	Lys	
1				5					10					15		
Tyr	Lys	Gly	Ser	Leu	Ser	Gln	Val	Ser	Ala	Val	Asp	Leu	Gly	Thr	His	
			20					25					30			
Val	Thr	Thr	Gln	Leu	Leu	Lys	Arg	His	Ser	Thr	Ile	Ser	Glu	Glu	Ile	
		35					40					45				
Asp	Gln	Val	Ile	Phe	Gly	Asn	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	Asn	Gly	Gln	Asn	
	50					55					60					
Pro	Ala	Arg	Gln	Ile	Ala	Ile	Asn	Ser	Gly	Leu	Ser	His	Glu	Ile	Pro	
65				70						75					80	
Ala	Met	Thr	Val	Asn	Glu	Val	Cys	Gly	Ser	Gly	Met	Lys	Ala	Val	Ile	
				85					90					95		
Leu	Ala	Lys	Gln	Leu	Ile	Gln	Leu	Gly	Glu	Ala	Glu	Val	Leu	Ile	Ala	
			100					105					110			
Gly	Gly	Ile	Glu	Asn	Met	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Leu	Gln	Arg	Phe	Asn	
		115					120					125				
Tyr	Glu	Thr	Glu	Ser	Tyr	Asp	Ala	Pro	Phe	Ser	Ser	Met	Met	Tyr	Asp	
	130					135						140				
Gly	Leu	Thr	Asp	Ala	Phe	Ser	Gly	Gln	Ala	Met	Gly	Leu	Thr	Ala	Glu	
145				150						155					160	
Asn	Val	Ala	Glu	Lys	Tyr	His	Val	Thr	Arg	Glu	Glu	Gln	Asp	Gln	Phe	
				165					170					175		
Ser	Val	His	Ser	Gln	Leu	Lys	Ala	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Glu	Gly	Ile	
			180					185					190			
Phe	Ala	Asp	Glu	Ile	Ala	Pro	Leu	Glu	Val	Ser	Gly	Thr	Leu	Val	Glu	
		195					200					205				
Lys	Asp	Glu	Gly	Ile	Arg	Pro	Asn	Ser	Ser	Val	Glu	Lys	Leu	Gly	Thr	
	210					215					220					
Leu	Lys	Thr	Val	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	
225				230						235					240	
Ser	Thr	Ile	Asn	Asp	Gly	Ala	Ser	Ala	Leu	Ile	Ile	Ala	Ser	Gln	Glu	
				245					250					255		
Tyr	Ala	Glu	Ala	His	Gly	Leu	Pro	Tyr	Leu	Ala	Ile	Ile	Arg	Asp	Ser	
			260					265					270			
Val	Glu	Val	Gly	Ile	Asp	Pro	Ala	Tyr	Met	Gly	Ile	Ser	Pro	Ile	Lys	
		275					280						285			

10

ES 2 786 226 T3

Ala Ile Gln Lys Leu Leu Ala Arg Asn Gln Leu Thr Thr Glu Glu Ile
 290 295 300
 Asp Leu Tyr Glu Ile Asn Glu Ala Phe Ala Ala Thr Ser Ile Val Val
 305 310 315 320
 Gln Arg Glu Leu Ala Leu Pro Glu Glu Lys Val Asn Ile Tyr Gly Gly
 325 330 335
 Gly Ile Ser Leu Gly His Ala Ile Gly Ala Thr Gly Ala Arg Leu Leu
 340 345 350
 Thr Ser Leu Ser Tyr Gln Leu Asn Gln Lys Glu Lys Lys Tyr Gly Val
 355 360 365
 Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Leu Gly Leu Ala Met Leu Leu Glu
 370 375 380
 Arg Pro Gln Gln Lys Lys Asn Ser Arg Phe Tyr Gln Met Ser Pro Glu
 385 390 395 400
 Glu Arg Leu Ala Ser Leu Leu Asn Glu Gly Gln Ile Ser Ala Asp Thr
 405 410 415
 Lys Lys Glu Phe Glu Asn Thr Ala Leu Ser Ser Gln Ile Ala Asn His
 420 425 430
 Met Ile Glu Asn Gln Ile Ser Glu Thr Glu Val Pro Met Gly Val Gly
 435 440 445
 Leu His Leu Thr Val Asp Glu Thr Asp Tyr Leu Val Pro Met Ala Thr
 450 455 460
 Glu Glu Pro Ser Val Ile Ala Ala Leu Ser Asn Gly Ala Lys Ile Ala
 465 470 475 480
 Gln Gly Phe Lys Thr Val Asn Gln Gln Arg Leu Met Arg Gly Gln Ile
 485 490 495
 Val Phe Tyr Asp Val Ala Asp Ala Glu Ser Leu Ile Asp Glu Leu Gln
 500 505 510
 Val Arg Glu Thr Glu Ile Phe Gln Gln Ala Glu Leu Ser Tyr Pro Ser
 515 520 525
 Ile Val Lys Arg Gly Gly Gly Leu Arg Asp Leu Gln Tyr Arg Ala Phe
 530 535 540
 Asp Glu Ser Phe Val Ser Val Asp Phe Leu Val Asp Val Lys Asp Ala
 545 550 555 560
 Met Gly Ala Asn Ile Val Asn Ala Met Leu Glu Gly Val Ala Glu Leu
 565 570 575
 Phe Arg Glu Trp Phe Ala Glu Gln Lys Ile Leu Phe Ser Ile Leu Ser
 580 585 590
 Asn Tyr Ala Thr Glu Ser Val Val Thr Met Lys Thr Ala Ile Pro Val
 595 600 605
 Ser Arg Leu Ser Lys Gly Ser Asn Gly Arg Glu Ile Ala Glu Lys Ile
 610 615 620
 Val Leu Ala Ser Arg Tyr Ala Ser Leu Asp Pro Tyr Arg Ala Val Thr
 625 630 635 640
 His Asn Lys Gly Ile Met Asn Gly Ile Glu Ala Val Val Leu Ala Thr
 645 650 655
 Gly Asn Asp Thr Arg Ala Val Ser Ala Ser Cys His Ala Phe Ala Val
 660 665 670
 Lys Glu Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Thr Ser Trp Thr Leu Asp Gly Glu
 675 680 685
 Gln Leu Ile Gly Glu Ile Ser Val Pro Leu Ala Leu Ala Thr Val Gly
 690 695 700
 Gly Ala Thr Lys Val Leu Pro Lys Ser Gln Ala Ala Ala Asp Leu Leu
 705 710 715 720
 Ala Val Thr Asp Ala Lys Glu Leu Ser Arg Val Val Ala Ala Val Gly
 725 730 735
 Leu Ala Gln Asn Leu Ala Ala Leu Arg Ala Leu Val Ser Glu Gly Ile
 740 745 750
 Gln Lys Gly His Met Ala Leu Gln Ala Arg Ser Leu Ala Met Thr Val
 755 760 765
 Gly Ala Thr Gly Lys Glu Val Glu Ala Val Ala Gln Gln Leu Lys Arg

ES 2 786 226 T3

770 775 780
 Gln Lys Thr Met Asn Gln Asp Arg Ala Leu Ala Ile Leu Asn Asp Leu
 785 790 795 800
 Arg Lys Gln

5 <210> 17
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

10 <400> 17

Met Ser Leu Pro Phe Leu Thr Ser Ala Pro Gly Lys Val Ile Ile Phe
 1 5 10 15
 Gly Glu His Ser Ala Val Tyr Asn Lys Pro Ala Val Ala Ala Ser Val
 20 25 30
 Ser Ala Leu Arg Thr Tyr Leu Leu Ile Ser Glu Ser Ser Ala Pro Asp
 35 40 45
 Thr Ile Glu Leu Asp Phe Pro Asp Ile Ser Phe Asn His Lys Trp Ser
 50 55 60
 Ile Asn Asp Phe Asn Ala Ile Thr Glu Asp Gln Val Asn Ser Gln Lys
 65 70 75 80
 Leu Ala Lys Ala Gln Gln Ala Thr Asp Gly Leu Ser Gln Glu Leu Val
 85 90 95
 Ser Leu Leu Asp Pro Leu Leu Ala Gln Leu Ser Glu Ser Phe His Tyr
 100 105 110
 His Ala Ala Phe Cys Phe Leu Tyr Met Phe Val Cys Leu Cys Pro His
 115 120 125
 Ala Lys Asn Ile Lys Phe Ser Leu Lys Ser Thr Leu Pro Ile Gly Ala
 130 135 140
 Gly Leu Gly Ser Ser Ala Ser Ile Ser Val Ser Leu Ala Leu Ala Met
 145 150 155 160
 Ala Tyr Leu Gly Gly Leu Ile Gly Ser Asn Asp Leu Glu Lys Leu Ser
 165 170 175
 Glu Asn Asp Lys His Ile Val Asn Gln Trp Ala Phe Ile Gly Glu Lys
 180 185 190
 Cys Ile His Gly Thr Pro Ser Gly Ile Asp Asn Ala Val Ala Thr Tyr
 195 200 205
 Gly Asn Ala Leu Leu Phe Glu Lys Asp Ser His Asn Gly Thr Ile Asn
 210 215 220
 Thr Asn Asn Phe Lys Phe Leu Asp Asp Phe Pro Ala Ile Pro Met Ile
 225 230 235 240
 Leu Thr Tyr Thr Arg Ile
 245

15 <210> 18
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 18

ES 2 786 226 T3

Met Ile Lys Val Ser Ala Pro Gly Lys Ile Leu Trp Ile Gly Ser Tyr
 1 5 10 15
 Ser Val Val Phe Gly Gly Ile Ser His Val Ile Ala Val Asn Lys Arg
 20 25 30
 Val Ser Cys Ser Leu Arg Glu Ile Lys Glu Lys Asp Ser Leu Ile Phe
 35 40 45
 His Thr Ser Tyr Gly His Phe Lys Asn Ser Gly Asn Glu Leu Ile Asn
 50 55 60
 Ser Val Leu Asp Thr Phe Arg Glu Arg Leu Ser Gln Leu Pro Gln Gly

65 70 75 80
 Tyr Glu Ile Asp Leu Tyr Asn Asp Lys Glu Phe Ile Ile Asp Gly Lys
 85 90 95
 Lys Thr Gly Leu Gly Ser Ser Ser Ala Ala Thr Val Ser Leu Thr Ala
 100 105 110
 Cys Leu Tyr Tyr Ala Ile His Gly Lys Leu Asp Leu Phe Glu Ile His
 115 120 125
 Lys Leu Ala Gln Ile Ala Asn Tyr Lys Arg Gln Lys Gly Ile Gly Ser
 130 135 140
 Gly Phe Asp Ile Ala Ser Ala Val Phe Gly Ser Ile Val Tyr Lys Arg
 145 150 155 160
 Phe Thr Asp Leu Asp Lys Met Asp Phe Tyr Phe Glu Lys Leu Asn Leu
 165 170 175
 Gly Asn Tyr Asp Met Met Leu Gly Phe Thr Gly Lys Ser Ser Glu Thr
 180 185 190
 Val Gly Leu Val Arg Lys Phe Val Glu Lys Ser Asn Leu Asp Asp Phe
 195 200 205
 Lys Glu Ile Met Arg Leu Ile Asp Glu Glu Asn Tyr Met Ala Ile Lys
 210 215 220
 Leu Ile Lys Leu Asn Lys Leu Asp Glu Ala Val Glu His Ile Lys Leu
 225 230 235 240
 Gly Arg Lys Tyr Leu Asn Tyr Ile Ala Glu Arg Ile Val Gly Val Lys
 245 250 255
 Leu Val Ser Lys Met Glu Glu Glu Leu Ile Lys Ile Ala Glu Glu Glu
 260 265 270
 Gly Ala Leu Val Ala Leu Ser Pro Gly Ala Gly Gly Gly Asp Ser Ile
 275 280 285
 Phe Ala Leu Gly Asn Asp Leu Asn Arg Val Arg Glu Ala Trp Ser Lys
 290 295 300
 Arg Gly Ile Phe Ile Ile Asp Val Lys Glu Asp Glu Gly Leu Arg Leu
 305 310 315 320
 Glu Ser Asn

5 <210> 19
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

10 <400> 19

ES 2 786 226 T3

Met Thr Val Tyr Thr Ala Ser Val Thr Ala Pro Val Asn Ile Ala Thr
 1 5 10 15
 Leu Lys Tyr Trp Gly Lys Arg Asp Thr Lys Leu Asn Leu Pro Thr Asn
 20 25 30
 Ser Ser Ile Ser Val Thr Leu Ser Gln Asp Asp Leu Arg Thr Leu Thr
 35 40 45
 Ser Ala Ala Thr Ala Pro Glu Phe Glu Arg Asp Thr Leu Trp Leu Asn
 50 55 60
 Gly Glu Pro His Ser Ile Asp Asn Glu Arg Thr Gln Asn Cys Leu Arg
 65 70 75 80
 Asp Leu Arg Gln Leu Arg Lys Glu Met Glu Ser Lys Asp Ala Ser Leu
 85 90 95
 Pro Thr Leu Ser Gln Trp Lys Leu His Ile Val Ser Glu Asn Asn Phe
 100 105 110
 Pro Thr Ala Ala Gly Leu Ala Ser Ser Ala Ala Gly Phe Ala Ala Leu
 115 120 125
 Val Ser Ala Ile Ala Lys Leu Tyr Gln Leu Pro Gln Ser Thr Ser Glu
 130 135 140
 Ile Ser Arg Ile Ala Arg Lys Gly Ser Gly Ser Ala Cys Arg Ser Leu
 145 150 155 160
 Phe Gly Gly Tyr Val Ala Trp Glu Met Gly Lys Ala Glu Asp Gly His

165 170 175
 Asp Ser Met Ala Val Gln Ile Ala Asp Ser Ser Asp Trp Pro Gln Met
 180 185 190
 Lys Ala Cys Val Leu Val Val Ser Asp Ile Lys Lys Asp Val Ser Ser
 195 200 205
 Thr Gln Gly Met Gln Leu Thr Val Ala Thr Ser Glu Leu Phe Lys Glu
 210 215 220
 Arg Ile Glu His Val Val Pro Lys Arg Phe Glu Val Met Arg Lys Ala
 225 230 235 240
 Ile Val Glu Lys Asp Phe Ala Thr Phe Ala Lys Glu Thr Met Met Asp
 245 250 255
 Ser Asn Ser Phe His Ala Thr Cys Leu Asp Ser Phe Pro Pro Ile Phe
 260 265 270
 Tyr Met Asn Asp Thr Ser Lys Arg Ile Ile Ser Trp Cys His Thr Ile
 275 280 285
 Asn Gln Phe Tyr Gly Glu Thr Ile Val Ala Tyr Thr Phe Asp Ala Gly
 290 295 300
 Pro Asn Ala Val Leu Tyr Tyr Leu Ala Glu Asn Glu Ser Lys Leu Phe
 305 310 315 320
 Ala Phe Ile Tyr Lys Leu Phe Gly Ser Val Pro Gly Trp Asp Lys Lys
 325 330 335
 Phe Thr Thr Glu Gln Leu Glu Ala Phe Asn His Gln Phe Glu Ser Ser
 340 345 350
 Asn Phe Thr Ala Arg Glu Leu Asp Leu Glu Leu Gln Lys Asp Val Ala
 355 360 365
 Arg Val Ile Leu Thr Gln Val Gly Ser Gly Pro Gln Glu Thr Asn Glu
 370 375 380
 Ser Leu Ile Asp Ala Lys Thr Gly Leu Pro Lys Glu
 385 390 395

5 <210> 20
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 20

ES 2 786 226 T3

Met Gln Thr Glu His Val Ile Leu Leu Asn Ala Gln Gly Val Pro Thr
 1 5 10 15
 Gly Thr Leu Glu Lys Tyr Ala Ala His Thr Ala Asp Thr Arg Leu His
 20 25 30
 Leu Ala Phe Ser Ser Trp Leu Phe Asn Ala Lys Gly Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Thr Arg Arg Ala Leu Ser Lys Lys Ala Trp Pro Gly Val Trp Thr Asn
 50 55 60
 Ser Val Cys Gly His Pro Gln Leu Gly Glu Ser Asn Glu Asp Ala Val
 65 70 75 80
 Ile Arg Arg Cys Arg Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ile Thr Pro Pro Glu
 85 90 95
 Ser Ile Tyr Pro Asp Phe Arg Tyr Arg Ala Thr Asp Pro Ser Gly Ile
 100 105 110
 Val Glu Asn Glu Val Cys Pro Val Phe Ala Ala Arg Thr Thr Ser Ala
 115 120 125
 Leu Gln Ile Asn Asp Asp Glu Val Met Asp Tyr Gln Trp Cys Asp Leu
 130 135 140
 Ala Asp Val Leu His Gly Ile Asp Ala Thr Pro Trp Ala Phe Ser Pro
 145 150 155 160
 Trp Met Val Met Gln Ala Thr Asn Arg Glu Ala Arg Lys Arg Leu Ser
 165 170 175
 Ala Phe Thr Gln Leu Lys
 180

- <210> 21
- <211> 595
- <212> PRT
- <213> Populus alba

- <400> 21

ES 2 786 226 T3

Met Ala Thr Glu Leu Leu Cys Leu His Arg Pro Ile Ser Leu Thr His
1 5 10 15
Lys Leu Phe Arg Asn Pro Leu Pro Lys Val Ile Gln Ala Thr Pro Leu
20 25 30
Thr Leu Lys Leu Arg Cys Ser Val Ser Thr Glu Asn Val Ser Phe Thr
35 40 45
Glu Thr Glu Thr Glu Ala Arg Arg Ser Ala Asn Tyr Glu Pro Asn Ser
50 55 60
Trp Asp Tyr Asp Tyr Leu Leu Ser Ser Asp Thr Asp Glu Ser Ile Glu
65 70 75 80
Val Tyr Lys Asp Lys Ala Lys Lys Leu Glu Ala Glu Val Arg Arg Glu
85 90 95
Ile Asn Asn Glu Lys Ala Glu Phe Leu Thr Leu Leu Glu Leu Ile Asp
100 105 110
Asn Val Gln Arg Leu Gly Leu Gly Tyr Arg Phe Glu Ser Asp Ile Arg
115 120 125
Gly Ala Leu Asp Arg Phe Val Ser Ser Gly Gly Phe Asp Ala Val Thr
130 135 140
Lys Thr Ser Leu His Gly Thr Ala Leu Ser Phe Arg Leu Leu Arg Gln
145 150 155 160
His Gly Phe Glu Val Ser Gln Glu Ala Phe Ser Gly Phe Lys Asp Gln
165 170 175
Asn Gly Asn Phe Leu Glu Asn Leu Lys Glu Asp Ile Lys Ala Ile Leu
180 185 190
Ser Leu Tyr Glu Ala Ser Phe Leu Ala Leu Glu Gly Glu Asn Ile Leu
195 200 205
Asp Glu Ala Lys Val Phe Ala Ile Ser His Leu Lys Glu Leu Ser Glu
210 215 220
Glu Lys Ile Gly Lys Glu Leu Ala Glu Gln Val Asn His Ala Leu Glu
225 230 235 240
Leu Pro Leu His Arg Arg Thr Gln Arg Leu Glu Ala Val Trp Ser Ile
245 250 255
Glu Ala Tyr Arg Lys Lys Glu Asp Ala Asn Gln Val Leu Leu Glu Leu
260 265 270
Ala Ile Leu Asp Tyr Asn Met Ile Gln Ser Val Tyr Gln Arg Asp Leu
275 280 285
Arg Glu Thr Ser Arg Trp Trp Arg Arg Val Gly Leu Ala Thr Lys Leu
290 295 300
His Phe Ala Arg Asp Arg Leu Ile Glu Ser Phe Tyr Trp Ala Val Gly
305 310 315 320
Val Ala Phe Glu Pro Gln Tyr Ser Asp Cys Arg Asn Ser Val Ala Lys
325 330 335
Met Phe Ser Phe Val Thr Ile Ile Asp Asp Ile Tyr Asp Val Tyr Gly
340 345 350
Thr Leu Asp Glu Leu Glu Leu Phe Thr Asp Ala Val Glu Arg Trp Asp
355 360 365
Val Asn Ala Ile Asn Asp Leu Pro Asp Tyr Met Lys Leu Cys Phe Leu
370 375 380
Ala Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Glu Ile Ala Tyr Asp Asn Leu Lys Asp
385 390 395 400
Lys Gly Glu Asn Ile Leu Pro Tyr Leu Thr Lys Ala Trp Ala Asp Leu
405 410 415
Cys Asn Ala Phe Leu Gln Glu Ala Lys Trp Leu Tyr Asn Lys Ser Thr

ES 2 786 226 T3

			420						425				430			
Pro	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Phe	Gly	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Ser	Ser	Gly	
		435					440					445				
Pro	Leu	Gln	Leu	Val	Phe	Ala	Tyr	Phe	Ala	Val	Val	Gln	Asn	Ile	Lys	
	450					455					460					
Lys	Glu	Glu	Ile	Glu	Asn	Leu	Gln	Lys	Tyr	His	Asp	Thr	Ile	Ser	Arg	
465					470					475					480	
Pro	Ser	His	Ile	Phe	Arg	Leu	Cys	Asn	Asp	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	
				485					490						495	
Glu	Ile	Ala	Arg	Gly	Glu	Thr	Ala	Asn	Ser	Val	Ser	Cys	Tyr	Met	Arg	
			500					505					510			
Thr	Lys	Gly	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Ala	Thr	Glu	Ser	Val	Met	Asn	Leu	
		515					520						525			
Ile	Asp	Glu	Thr	Trp	Lys	Lys	Met	Asn	Lys	Glu	Lys	Leu	Gly	Gly	Ser	
	530					535					540					
Leu	Phe	Ala	Lys	Pro	Phe	Val	Glu	Thr	Ala	Ile	Asn	Leu	Ala	Arg	Gln	
545					550					555					560	
Ser	His	Cys	Thr	Tyr	His	Asn	Gly	Asp	Ala	His	Thr	Ser	Pro	Asp	Glu	
				565					570					575		
Leu	Thr	Arg	Lys	Arg	Val	Leu	Ser	Val	Ile	Thr	Glu	Pro	Ile	Leu	Pro	
			580					585					590			
Phe	Glu	Arg														
		595														

REIVINDICACIONES

1. Una ruta metabólica recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética en un sistema exento de células o un microorganismo que comprende una pluralidad de etapas enzimáticas que convierten un sustrato en un producto, en la que la ruta incluye una producción desequilibrada y la utilización de un primer cofactor, comprendiendo dicha ruta:
- una primera enzima dependiente de cofactores que puede convertir un primer sustrato en un segundo sustrato, dicha enzima da lugar a la producción desequilibrada y a la utilización de un primer cofactor;
- una segunda enzima dependiente de cofactores que también puede convertir el primer sustrato en el segundo sustrato, en la que la segunda enzima dependiente de cofactores es un mutante de la primera enzima dependiente de cofactores que se ha modificado para tener su preferencia de cofactores alterada hacia un segundo cofactor; y
- una enzima que recicla el primer cofactor,
- en la que el primer cofactor comprende NAD^+/NADH y el segundo cofactor comprende $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, y en la que la ruta comprende una NADH deshidrogenasa, una NADPH deshidrogenasa que es una NADH deshidrogenasa mutante que utiliza NADP^+ en vez de NAD^+ , y una NADH oxidasa.
2. La ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética de la reivindicación 1, en la que la NADH deshidrogenasa es un complejo de una NADH piruvato deshidrogenasa.
3. La ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética de la reivindicación 2, en la que el complejo de la NADH piruvato deshidrogenasa comprende una subunidad a de la piruvato deshidrogenasa, una subunidad b de la piruvato deshidrogenasa, una dihidrolipoamida acetiltransferasa, y una dihidrolipoamida deshidrogenasa.
4. La ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética de la reivindicación 3, en la que la subunidad a de la piruvato deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:1, en la que la subunidad b de la piruvato deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:2, en la que la dihidrolipoamida acetiltransferasa comprende una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3, en la que la dihidrolipoamida deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 %, idéntica a la SEQ ID NO: 5, en la que el complejo convierte el piruvato en acetil-CoA, o en la que la dihidrolipoamida deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:5 y que comprende las mutaciones E206V, G207R, A208K, y S213R.
5. La ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la NADPH deshidrogenasa es un complejo de una NADPH piruvato deshidrogenasa mutante que utiliza NADP^+ .
6. La ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética de la reivindicación 5, en la que el complejo de la piruvato deshidrogenasa mutante comprende una subunidad a de la piruvato deshidrogenasa, una subunidad b de la piruvato deshidrogenasa, una dihidrolipoamida acetiltransferasa, y una dihidrolipoamida deshidrogenasa mutante que utiliza preferentemente NADP^+ .
7. La ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética de la reivindicación 6, en la que la subunidad a de la piruvato deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:1, en la que la subunidad b de la piruvato deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:2, en la que la dihidrolipoamida acetiltransferasa comprende una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:3, y en la que la dihidrolipoamida deshidrogenasa comprende una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO:7 y utiliza preferentemente NADP^+ , en la que el complejo convierte el piruvato en acetil-CoA.
8. La ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la NADH oxidasa es una NoxE u homóloga de la misma y en la que la NADH oxidasa comprende una secuencia que es al menos un 50 % idéntica a la SEQ ID NO: 10.
9. La ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética de una cualquiera de las anteriores reivindicaciones en la que la ruta recombinante, artificial o diseñada mediante ingeniería genética produce PHB, isopreno o un compuesto isoprenoide.

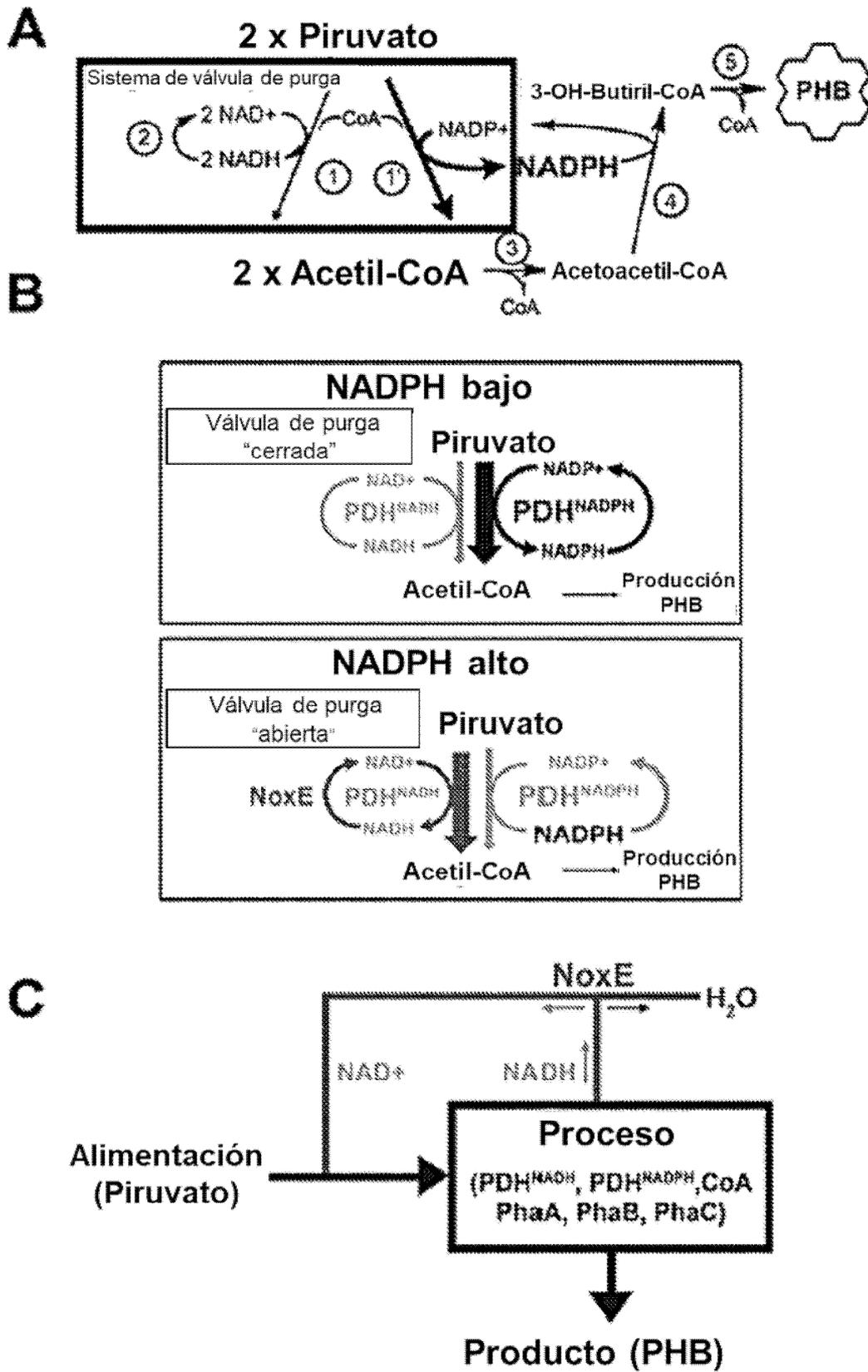


Figura 1A-C

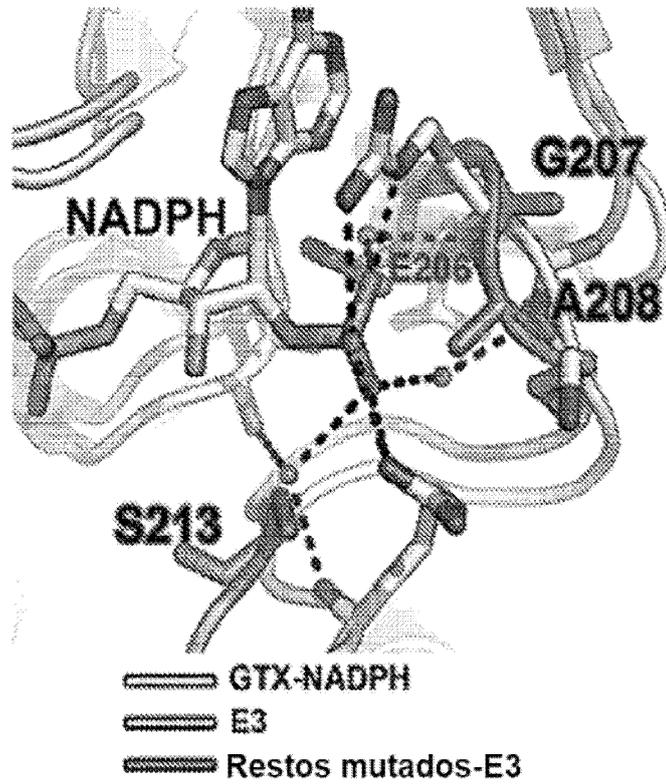


Figura 2

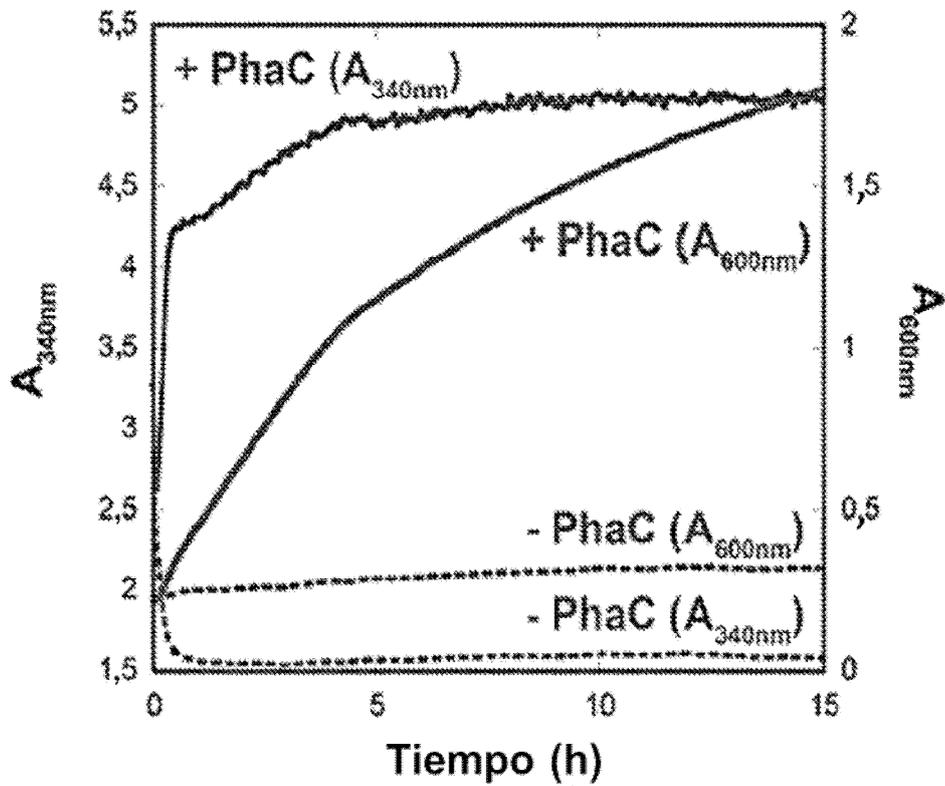


Figura 3

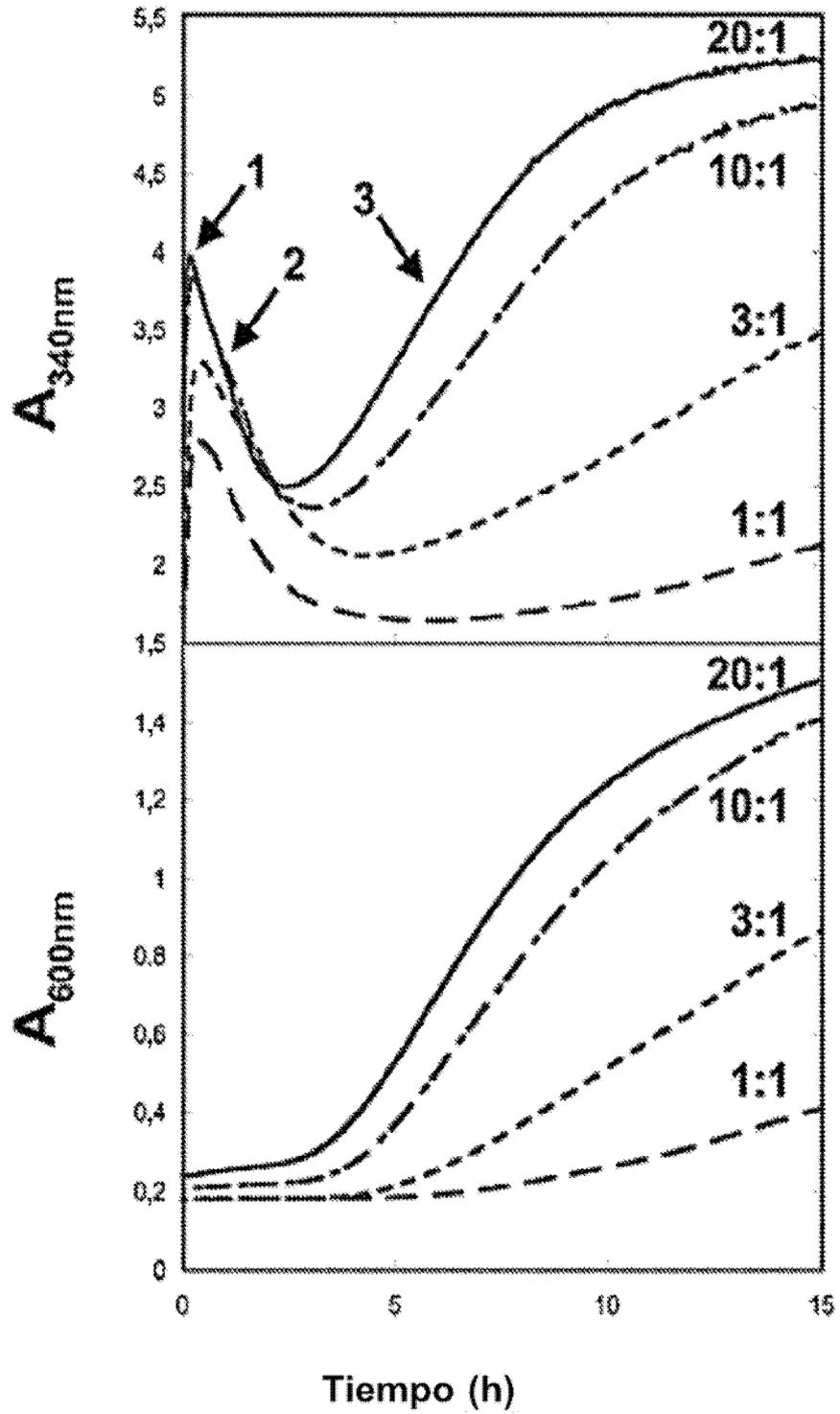
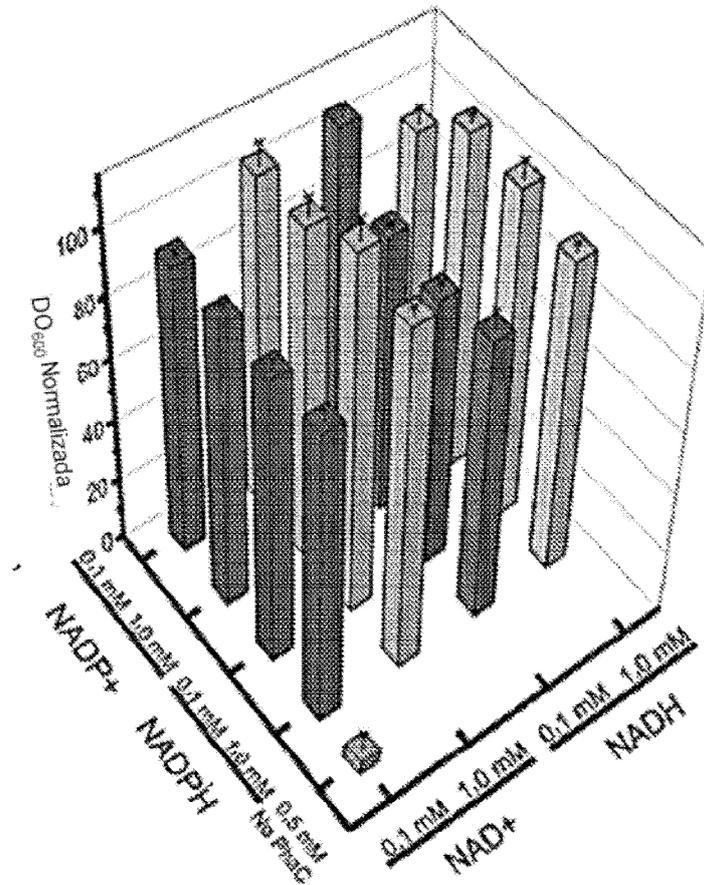


Figura 4

A



B

		NAD ⁺		NADH	
		0.1 mM	1 mM	0.1 mM	1 mM
		Rendimiento relativo	Rendimiento relativo	Rendimiento relativo	Rendimiento relativo
NADP ⁺	0.1 mM	93.01 ± 0.77	93.87 ± 2.13	91.87 ± 1.71	93.79 ± 2.97
	1 mM	106.53 ± 6.21	115.32 ± 5.27	114.50 ± 5.42	109.48 ± 1.70
NADPH	0.1 mM	108.29 ± 2.45	89.89 ± 0.53	86.38 ± 1.56	90.37 ± 4.91
	1 mM	93.99 ± 4.33	108.13 ± 2.00	106.16 ± 4.52	100.82 ± 1.84

Figura 5A-B

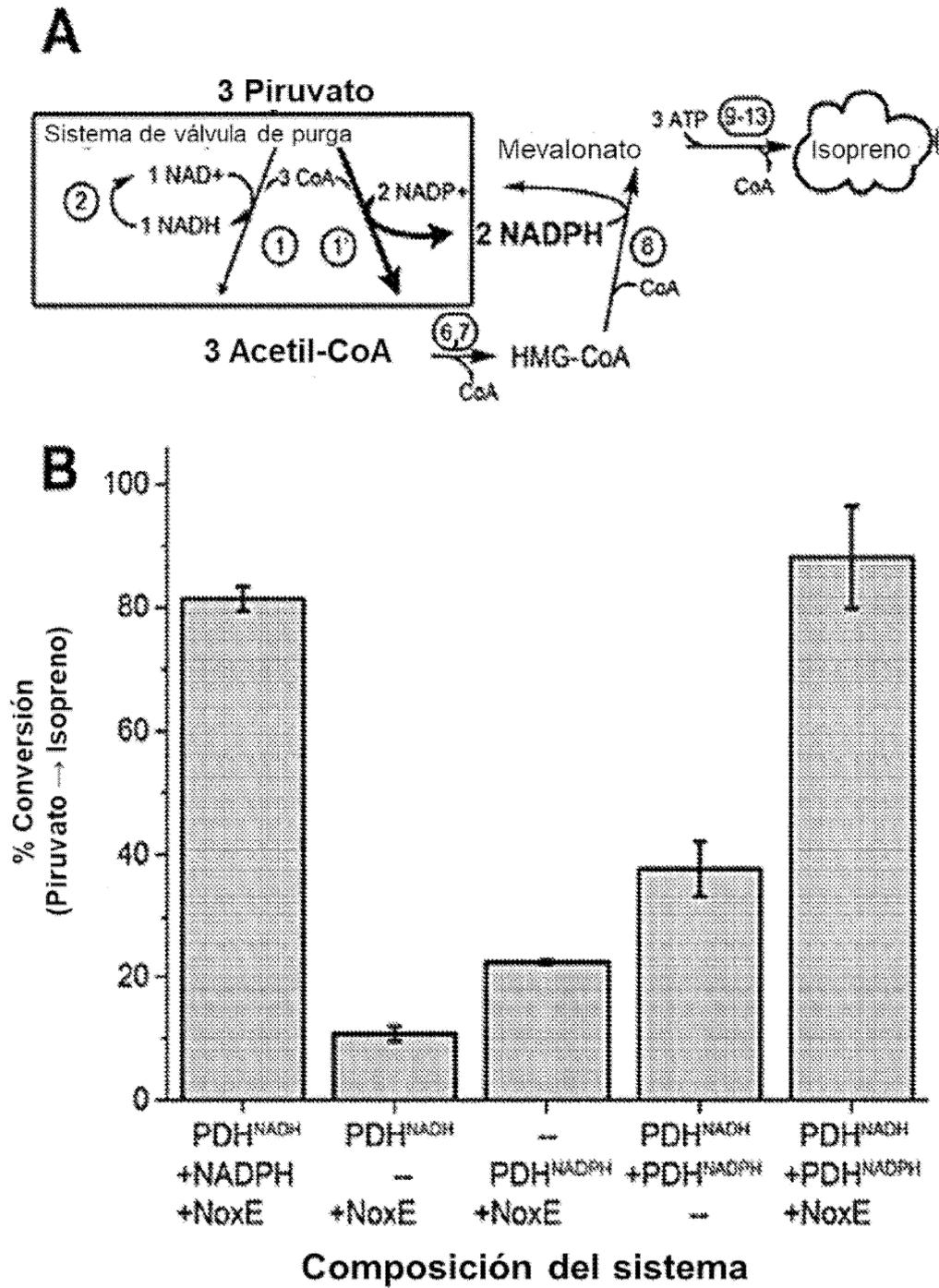


Figura 6A-B

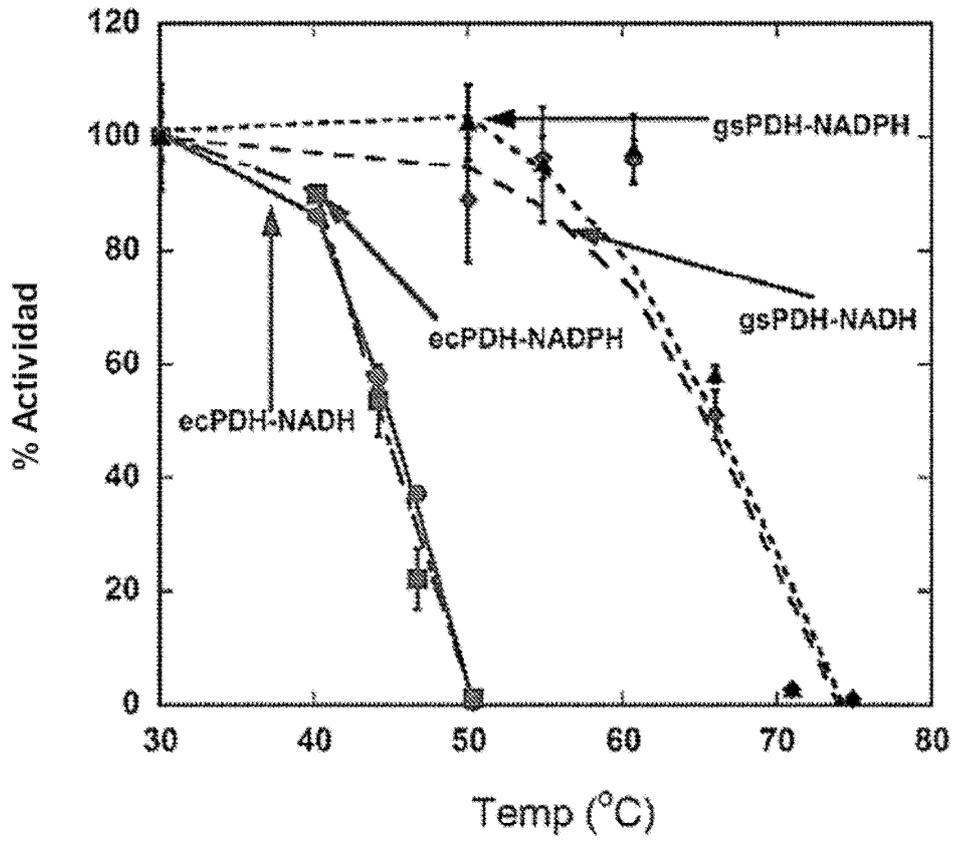


Figura 7

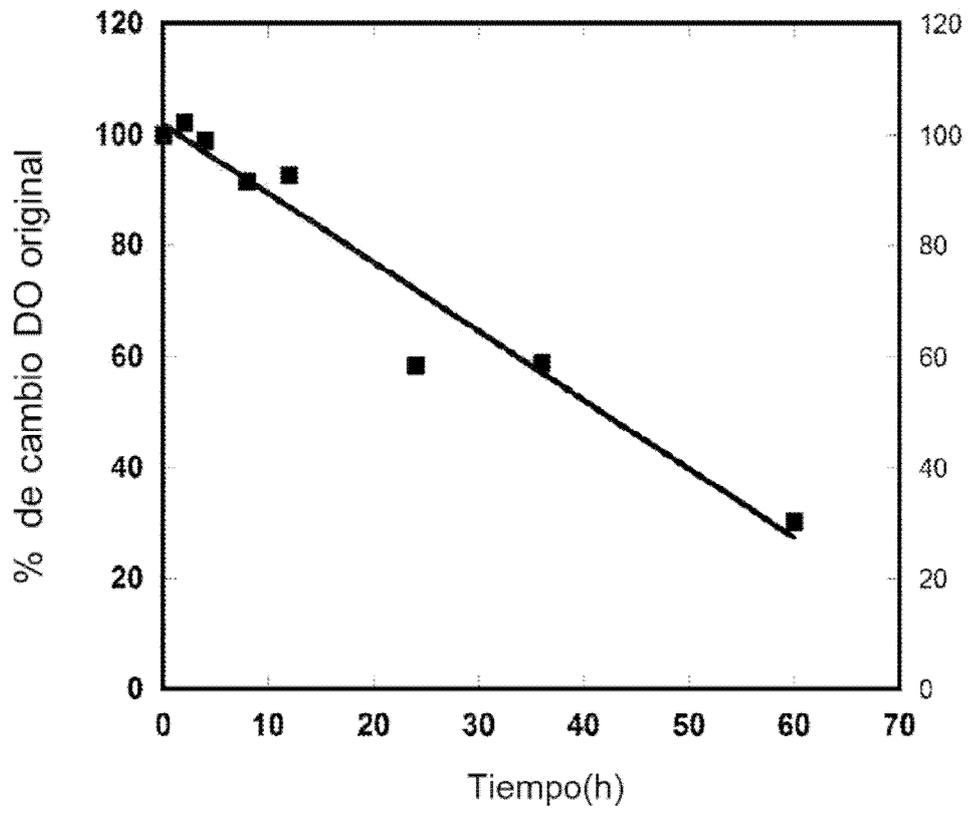


Figura 8